



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología

TESIS DOCTORAL

**Caracterización de aislados de *Escherichia coli* de
origen clínico y alimentario productores de
betalactamasas de espectro extendido**

Trabajo realizado para alcanzar el grado de Doctor por la Licenciada
en Biología D^a. María del Pilar Egea Miranda

Sevilla, 27 de mayo de 2014



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología

Dra. D^a. Lorena López Cerero, Profesor Asociado Clínico del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla y Dr. D. Jesús Rodríguez Baño, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN:

Que la tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla que lleva por título "Caracterización de aislados de *Escherichia coli* de origen clínico y alimentario productores de betalactamasas de espectro extendido" ha sido realizada por D^{ña}. María del Pilar Egea Miranda bajo nuestra supervisión, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Y para que conste donde proceda firmamos el presente certificado en Sevilla a 27 de mayo de 2014.

Fdo. Dra. D^a. Lorena López Cerero

Dr. D. Jesús Rodríguez Baño

Agradecimientos

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, de uno u otro modo, han hecho posible la realización de esta tesis doctoral.

A los Doctores Lorena López Cerero y Jesús Rodríguez Baño, directores de este trabajo de investigación, por su dedicación y apoyo durante estos años.

A los profesores Álvaro Pascual y E. J. Perea, por aceptarme bajo su tutela como doctorando en este Departamento y el apoyo brindado.

A la Doctora María Dolores Navarro, por su inestimable colaboración en esta tesis y a todo el personal facultativo, residentes, técnicos y administrativos de la UGC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología por su profesionalidad y colaboración desinteresada.

Al Doctor Javier Aznar, por su amabilidad al colaborar como tutor de máster.

Al Doctor Jorge Blanco, Azucena Mora y a todo el personal del Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli* de Lugo, por acogerme con tanta amabilidad en su laboratorio para llevar a cabo parte de este trabajo.

Agradecer a todas las personas con las que he compartido el día a día estos últimos años en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla. A los Doctores Jose Manuel Rodríguez, Carmen Conejo, Isabel García, Sofía Ballesta y Carmen Velasco. A "los niños", Fran, Paula y especialmente a Lara, por su colaboración, gracias por vuestra ayuda y por todos los buenos momentos. Igualmente gracias a Fany, Mar, Mercedes y Eva por estar ahí, cada día, ayudando en lo que sea necesario. A Encarni, Alejandra y Jesús, por estar siempre dispuestos a resolver mis problemas con el "formato" y por su amistad.

A mis amigos y a mi familia, por su apoyo y cariño incondicional.

TESIS DOCTORAL

Caracterización de aislados de *Escherichia coli* de origen clínico y alimentario productores de betalactamasas de espectro extendido

Autor: María del Pilar Egea Miranda

RESUMEN

Escherichia coli, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, es el comensal más prevalente en el tracto gastrointestinal de humanos y uno de los principales agentes causantes de un amplio espectro de infecciones en humanos. En la última década hemos asistido a un incremento significativo de la resistencia de estos microorganismos a diferentes familias de antimicrobianos de uso clínico (multirresistencia). Entre los mecanismos que originan la multirresistencia en *E. coli* destacan las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), enzimas capaces de hidrolizar las penicilinas, las cefalosporinas de amplio espectro y los monobactames, lo que complica el manejo de estas infecciones. Desde su aparición, la prevalencia de *E. coli* productor de BLEE (ECBLEE) a nivel mundial ha ido en aumento y en los últimos años la epidemiología de las infecciones causadas por ECBLEE ha experimentado cambios significativos, siendo en la actualidad frecuentes los casos de infecciones no solo nosocomiales, sino también comunitarias. La hipótesis de trabajo fue que los alimentos podrían actuar como reservorio de ECBLEE y que estos microorganismos o los elementos genéticos móviles que portan las BLEE podrían diseminarse en la comunidad a través de la cadena alimentaria, jugando un papel importante en la epidemiología de la infección por ECBLEE. Para validar estas hipótesis se analizó un grupo de muestras de origen alimentario mayoritariamente de origen cárnico, con el fin de aislar los posibles ECBLEE colonizadores de las mismas. Estos aislados, las BLEE que expresaban y un conjunto de plásmidos de interés fueron caracterizados y comparados posteriormente con un grupo de aislados de origen clínico humano, con el fin de determinar si existía relación entre aislados humanos y de origen animal. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que la cadena alimentaria puede actuar de reservorio de BLEE, principalmente como fuente de plásmidos portadores de genes *bla*_{SHV-12} y con menor frecuencia de aislados productores de BLEE. No obstante, el reservorio asociado a la ingesta y manipulación de alimentos cárnicos sólo explica una parte de la diseminación de BLEE, existiendo otros fenómenos como la introducción de un clon virulento productor de CTX-M-15 entre aislados clínicos no relacionados con la cadena alimentaria.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
<i>Índice de tablas</i>	7
<i>Índice de figuras</i>	11
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1 <i>Antibióticos betalactámicos</i>	17
1.1.1 Penicilinas	17
1.1.2 Cefalosporinas	18
1.1.3 Carbapenemas	19
1.1.4 Monobactámicos	19
1.1.5 Inhibidores de betalactamasa	19
1.2 <i>Mecanismos de resistencia a betalactámicos</i>	23
1.3 <i>Betalactamasas: Características y clasificaciones</i>	24
1.3.1 Caracterización química	24
1.3.2 Clasificaciones de las betalactamasas	25
1.3.2.1 BLEE tipo TEM	29
1.3.2.2 BLEE tipo SHV	30
1.3.2.3 BLEE tipo CTX-M	30
1.3.2.4 BLEE tipo OXA	31
1.3.2.5 Otras BLEE	31
1.3.3 Dispersión de los genes <i>bla</i>	32
1.4 <i>Método de detección de BLEE con inhibidores</i>	34
1.4.1 Dificultad de detección	35
1.5 <i>Origen y evolución de las betalactamasas de espectro extendido</i>	36
1.6 <i>Estructura poblacional de Escherichia coli. Filogenia y virulencia</i>	38
1.7 <i>Epidemiología actual de las enterobacterias productoras de BLEE</i>	39
1.7.1 Factores de riesgo para la infección por enterobacterias productoras de BLEE	43
1.7.2 Corresistencia y manejo terapéutico	44
1.7.3 Problema de salud pública	46
1.8 <i>Detección de enterobacterias BLEE en animales destinados al consumo humano y animales de compañía</i>	47

1.9 Detección de enterobacterias BLEE en alimentos.....	48
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	53
2.1 Hipótesis.....	53
2.2 Objetivos.....	53
3. MATERIAL	59
3.1 Cepas bacterianas	59
3.1.1 Aislados clínicos.....	59
3.1.2 Aislados de origen alimentario.....	59
3.1.3 Cepas control.....	60
3.1.4 Cepas para experimentos de conjugación y transformación	61
3.2 Medios de cultivo.....	61
3.3 Productos químicos y microbiológicos.....	63
3.4 Antimicrobianos.....	66
3.5 Equipos	68
3.6 Software	68
3.7 Cebadores.....	69
4. MÉTODOS	74
4.1 Aislamiento e identificación de aislados de origen alimentario	74
4.1.1 Procesamiento de las muestras cárnica.....	74
4.1.1.1 Siembra para recuento de coliformes totales	75
4.1.1.2 Screening de <i>E. coli</i> en muestras cárnica	75
4.1.2 Procesamiento de la superficie de los huevos	75
4.1.3 Procesamiento de otros alimentos.....	76
4.2 Aislamiento e identificación de aislados clínicos	76
4.3 Estudio de sensibilidad a antimicrobianos.....	76
4.3.1 Kirby-Bauer	77
4.3.2 Microdilución. Sistema WIDER	77
4.3.3 Métodos fenotípicos para la detección de la producción de BLEE.....	78
4.4 Caracterización de las enzimas BLEE	78
4.4.1 Isoelectroenfoco	78

4.4.2 PCR de genes <i>bla</i>	81
4.4.3 Secuenciación de los genes que codifican BLEE	82
4.5 Estudio de la relación clonal	82
4.5.1 REP-PCR.....	83
4.5.2 Electroforesis en campo pulsante (PFGE)	84
4.5.3 Multi-Locus Sequence Typing	88
4.6 Análisis de filogrupos	89
4.7 Análisis de Factores de Virulencia.....	89
4.8 Serotipado.....	90
4.9 Análisis de plásmidos	93
4.9.1 Conjugación	93
4.9.2 Transformación	94
4.9.2.1 Extracción de ADN plasmídico: método KADO	94
4.9.2.2 Inducción de electrocompetencia en células receptoras	95
4.9.2.3 Transformación por electroporación	95
4.9.3 Comprobación de cepas transconjugantes y transformantes	96
4.9.4 Restricción de ADN plasmídico	96
4.9.4.1 Digestión de plásmidos con S1 exonucleasa.....	96
4.9.4.2 Digestión de plásmidos con <i>HpaI</i>	98
4.9.5 Caracterización del entorno genético de <i>bla</i> _{CTX-M-15}	102
4.9.6 Extracción de ADN plasmídico mediante el método de Kieser.....	103
4.9.7 Caracterización del grupo de incompatibilidad plasmídico: tipado y subtipado.....	103
4.10 Recogida de datos epidemiológicos.....	104
4.11 Tamaño muestral.....	105
4.12 Análisis estadístico.....	106
5. RESULTADOS	111
5.1 Análisis de la prevalencia de ECBLEE	111
5.1.1 Muestras clínicas.....	111
5.1.2 Muestras alimentarias	111
5.1.2.1 Colonización por coliformes	111
5.1.2.2 ECBLEE	113
5.2 Sensibilidad a antimicrobianos	116
5.2.1 Aislados de origen clínico.....	116

5.2.2 Aislados de origen alimentario.....	120
5.2.3 Comparación entre aislados clínicos y alimentarios.....	122
5.3 Prevalencia de genes bla	123
5.3.1 Aislados de origen clínico	123
5.3.2 Aislados de origen alimentario.....	125
5.3.2.1 Origen cárnico	125
5.3.2.2 Otros alimentos	127
5.3.3 Comparación entre aislados clínicos y alimentarios.....	127
5.4 Prevalencia de Filogrupos.....	128
5.4.1 Aislados de origen clínico	128
5.4.2 Aislados de origen alimentario.....	128
5.4.3 Comparación entre aislados clínicos y alimentarios.....	129
5.4.4 Comparación entre tipos de BLEE	129
5.5 Serogrupo y factores de virulencia (FV).....	130
5.5.1 Análisis de FV.....	131
5.5.2 Análisis de serogrupos.....	140
5.5.2.1 <i>E. coli</i> productor de CTX-M-15	140
5.5.2.2 <i>E. coli</i> productor de SHV-12	141
5.5.2.3 Comparación entre aislados clínicos y alimentarios	142
5.6 Estudio de clonalidad.....	144
5.6.1 Estudio de clonalidad de <i>E. coli</i> productor de SHV-12	144
5.6.2 Estudio de clonalidad de <i>E. coli</i> productor de CTX-M-15	146
5.6.2.1 <i>E. coli</i> productor de CTX-M-15, filogrupo B2 ₃	146
5.6.2.2 <i>E. coli</i> productor de CTX-M-15, filogrupo A1.....	147
5.6.3 Estudio de clonalidad de otros aislados ECBLEE.....	147
5.7 Caracterización de plásmidos.....	148
5.7.1 Plásmidos de <i>E. coli</i> productor de CTX-M-15 pertenecientes al filogrupo A1.....	148
5.7.2 Plásmidos de <i>E. coli</i> productor de SHV-12 pertenecientes al filogrupo A1	151
6. DISCUSIÓN	157
6.1 Características de ECBLEE de origen clínico.....	158
6.2 Características de ECBLEE de origen alimentario	170
6.2.1 Productos cárnicos frescos	170
6.2.2 Otros productos.....	175

6.3 Comparación de aislados de origen humano y alimentario.....	177
6.4 Comparación con los resultados de animales de producción (sanos, enfermos y suelos de granja).....	182
6.5 Vías de transferencia de BLEE entre alimentos y humanos	184
6.5.1 Diseminación clonal	184
6.5.2 Diseminación horizontal: características de SHV-12.....	191
6.6 Implicaciones epidemiológicas y para el control.....	193
7. CONCLUSIONES	205
BIBLIOGRAFÍA	¡Error! Marcador no definido.
ANEXOS	247
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	257

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Índice de tablas

Tabla 1. Principales grupos de antibióticos betalactámicos. Tomado de "Manual of Clinical Microbiology" (9th edition) (1)	21
Tabla 2. Clasificación y propiedades de las betalactamasas según Bush, Jacoby y Medeiros. NI: No incluido	27
Tabla 3. Clasificación de las BLEE tipo CTX-M en función de su secuencia aminoacídica. Modificado de Bonnet y cols., 2004. (2)	31
Tabla 4. Antimicrobianos recomendados para llevar a cabo el despistaje de producción de BLEE en cepas de <i>E.coli</i> e interpretación de los resultados. Tomado del documento M100-S19, Vol 29 Nº 3, apéndice A, del CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute); (55).....	34
Tabla 5. Número de muestras incluidas en el estudio	60
Tabla 6. Cepas de la colección ECOR utilizadas en el estudio	61
Tabla 7. Solventes y diluyentes usados para la preparación de los antimicrobianos	66
Tabla 8. Discos de antibióticos utilizados para la determinación de sensibilidad y carga de los mismos. (Oxoid, Reino Unido)	67
Tabla 9. Cebadores específicos del tipo de BLEE (TIB Molbiol, Alemania)	69
Tabla 10. Cebadores utilizados para llevar a cabo la REP-PCR (Amersham Pharmacia Biotech, España)	69
Tabla 11. Cebadores utilizados en el estudio de filogrupos (Invitrogen, Carlsbad, Canadá)	69
Tabla 12. Cebadores utilizados para el serotipado de cepas (Invitrogen, Carlsbad, Canadá)	70
Tabla 13. Cebadores utilizados para la amplificación de genes de virulencia. Invitrogen, Carlsbad, Canadá	70
Tabla 14. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes asociados al gen <i>bla</i> _{CTX-M-15} y del entorno genético del mismo.....	71
Tabla 15. Cebadores utilizados para el tipado de plásmidos (caracterización del grupo de incompatibilidad) por PCR-Based Replicon Typing (PBRT).....	72
Tabla 16. Cebadores utilizados para el subtipado de plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad I1.....	73
Tabla 17. Mezcla maestra utilizada para realizar la PCR del alelo O25. Co:Concentración inicial; Cf: Concentración final; Vp: Volumen parcial	92
Tabla 18. Grado de colonización por coliformes de las muestras de origen cárnico en función del establecimiento de origen	112

Tabla 19. Porcentaje de muestras cárnicas crudas con ECBLEE en función del grado de colonización por coliformes. Realizado sobre 94 (86%) muestras cárnicas en las que se determinó el grado de colonización	115
Tabla 20. Frecuencia de muestras positivas en función del establecimiento de origen y tipo de animal. (GS: grandes superficies; SM: supermercado; ME: mercado).	116
Tabla 21. Frecuencia de muestras positivas con ECBLEE de ave y otros productos cárnicos en función del establecimiento de origen. (GS: grandes superficies; SM: supermercado; ME: mercado).....	116
Tabla 22. Distribución de la sensibilidad a los antimicrobianos evaluados de aislados ECBLEE procedentes de muestras clínicas. AMC: amoxicilina / ácido clavulánico, AK: amikacina; CN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; FOT: fosfomicina, FOX: cefoxitina; IP: imipenem; MEM: meropenem; NA: ácido nalidíxico; NIT: nitrofurantoína; TZP: piperacilina / tazobactam; TOB: tobramicina; TSX: cotrimoxazol.	117
Tabla 23. Prevalencia de aislados <i>E. coli</i> de origen clínico sensibles a tobramicina, ciprofloxacino y cotrimoxazol en función del grupo de BLEE producida.....	118
Tabla 24. Perfiles de resistencia a antibióticos y frecuencia de aislados ECBLEE de origen clínico resistentes a 1 o más familias de antibióticos. AMC: amoxicilina / ácido clavulánico, AK: amikacina; CN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; FOT: fosfomicina, FOX: cefoxitina; NA: ácido nalidíxico; TZP: piperacilina / tazobactam; TOB: tobramicina; TSX: cotrimoxazol.....	119
Tabla 25. Sensibilidad a antimicrobianos en aislados clínicos de ECBLEE en función del origen de la infección (comunitaria, nosocomial y relacionada con la asistencia sanitaria). AMC: amoxicilina / ácido clavulánico, AK: amikacina; CN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; FOT: fosfomicina, FOX: cefoxitina; IP: imipenem; MEM: meropenem; NA: ácido nalidíxico; TZP: piperacilina / tazobactam; TOB: tobramicina; TSX: cotrimoxazol.....	120
Tabla 26. Distribución de aislados de ECBLEE de origen alimentario sensibles (S), intermedios (I) y resistentes (R) a los antimicrobianos evaluados. AMC: amoxicilina / ácido clavulánico, AK: amikacina; CN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; ETP: ertapenem; FOT: fosfomicina, FOX: cefoxitina; NA: ácido nalidíxico; TZP: piperacilina / tazobactam; TOB: tobramicina.	121
Tabla 27. Perfiles de resistencia a antibióticos y frecuencia de aislados ECBLEE de origen cárnico resistentes a 1 o más familias de antibióticos. AMC: amoxicilina / ácido clavulánico; CN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; FOX: cefoxitina; NA: ácido nalidíxico; TOB: tobramicina	122
Tabla 28. Prevalencia de aislados <i>E. coli</i> de origen alimentario sensibles a tobramicina y ciprofloxacino en función del grupo de BLEE producida. Todas las comparaciones hechas con el Test de Fisher	122
Tabla 29. Frecuencias de BLEE detectadas en los aislados ECBLEE de origen clínico.....	123

Tabla 30. Frecuencia de los distintos grupos de BLEE según el origen de la infección. NOS: nosocomial, RAS: relacionado con la atención sanitaria, CE: comunitario estricto. *Única comparación estadísticamente significativa	124
Tabla 31. Frecuencia de BLEE en <i>E. coli</i> de origen cárnico.....	126
Tabla 32. Frecuencia de cada tipo de BLEE en cepas de <i>E. coli</i> procedentes de muestras cárnicas crudas. Porcentajes calculados respecto al número de ECBLEE aislados de cada tipo de carne	126
Tabla 33. Distribución de BLEE en <i>E. coli</i> de origen alimentario en función del tipo de establecimiento de origen de la muestra cárnica.....	127
Tabla 34. Distribución de filogrupos en aislados clínicos y de origen alimentario ($p=0,001$). NT: no tipable. No se incluye la cepa ECBLEE aislada de vegetales crudos	129
Tabla 35. Distribución de los filogrupos según el tipo de BLEE en el total de aislados ECBLEE (origen clínico y alimentario). Los porcentajes se calcularon respecto al número total de aislados productores de cada grupo de BLEE. FG: filogrupo	129
Tabla 36. Distribución de filogrupos en aislados de origen alimentario y clínico según el tipo de BLEE producida. Los porcentajes se calcularon respecto al total de aislados de cada origen productores de un grupo de BLEE	130
Tabla 37. Prevalencia de genes de virulencia en ECBLEE en función de su origen clínico o alimentario	131
Tabla 38. Prevalencia de genes de virulencia en ECBLEE de los diferentes filogrupos en función de su origen clínico o alimentario	132
Tabla 39. Prevalencia de genes de virulencia en <i>E. coli</i> en función del tipo de BLEE producida	133
Tabla 40. Características de las cepas de <i>E. coli</i> productoras de SHV-12 clasificadas como ExPEC. NT: no tipable; FG: filogrupo	134
Tabla 41. Frecuencia de los genes de virulencia <i>fimH</i> , <i>cdt</i> y <i>cvaC</i> en <i>E. coli</i> productor de SHV-12 en función de su origen.....	134
Tabla 42. Comparación del número de FV presentes en <i>E. coli</i> en función de la sensibilidad al ácido nalidíxico. *Se compararon los porcentajes de aislados con 2 o más FV.....	136
Tabla 43. Comparación del número de FV presentes en <i>E. coli</i> en función de la sensibilidad a ciprofloxacino. *Se compararon los porcentajes de aislados con 2 o más FV	137
Tabla 44. Comparación del número de FV determinantes del estatus ExPEC presentes en <i>E. coli</i> en función de la sensibilidad al ácido nalidíxico. *Se compararon los porcentajes de aislados ECBLEE con 2 o más FV.....	138
Tabla 45. Comparación del número de FV determinantes del estatus ExPEC presentes en <i>E. coli</i> en función de la sensibilidad al ciprofloxacino. *Se compararon los porcentajes de aislados ECBLEE con 2 o más FV.....	139

Tabla 46. Grupos de Incompatibilidad de plásmidos de <i>E. coli</i> productor de SHV-12 perteneciente al filogrupo A1 de origen clínico y alimentario. *No se obtuvo transconjungante o transformante. ST: Secuenciotipo; RAS: relacionado con la atención sanitaria	152
Tabla 47. Elementos genéticos asociados a la movilización de BLEE. Revisado en Poirel y cols. 2008 (3) y Sabaté y cols. 2002 (4)	162
Tabla 48. Prevalencia de infecciones por ECBLEE en función del origen en los estudios GEIH-BLEE-2006 y el estudio actual	163
Tabla 49. Frecuencia de los distintos tipos de BLEE en aislados de <i>E. coli</i> de los estudios GEIH-BLEE 2000, GEIH-BLEE-2006 y de este trabajo.....	164
Tabla 50. Cronología de la descripción de las enzimas CTX-M	166
Tabla 51. Relación de estudios de enterobacterias productoras de BLEE en pacientes no hospitalizados. ND: No determinado * Porcentaje del total de aislados.....	168
Tabla 52. Distribución y frecuencia del clon ST131 en humanos .NE: No especificado. FQ: Fluorquinolonas.	187

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de los betalactámicos	22
Figura 2. Distribución de aislados ECBLEE por tipo de muestra clínica	111
Figura 3. Distribución del grado de colonización de alimentos cárnicos crudos	112
Figura 4. Distribución del grado de colonización de alimentos cárnicos cocinados.....	113
Figura 5. Frecuencia de colonización de vegetales crudos	113
Figura 6. Prevalencia de ECBLEE en los distintos tipos de muestras cárnicas crudas estudiadas.....	114
Figura 7. Distribución de muestras positivas y negativas para ECBLEE de origen alimentario adquiridas en grandes superficies (GS), supermercados (ME) y mercados (ME).....	115
Figura 8. Distribución de aislados ECBLEE resistentes a los distintos antimicrobianos en función de su origen	123
Figura 9. Prevalencia de genes <i>bla</i> en cepas de ECBLEE de origen clínico en función del origen de la infección.....	125
Figura 10. Grupos de BLEE producidas por aislados de <i>E. coli</i> de origen clínico y alimentario	127
Figura 11. Distribución de filogrupos en los aislados ECBLEE de origen clínico	128
Figura 12. Distribución de filogrupos en los aislados ECBLEE de origen alimentario	128
Figura 13. Distribución de los FV <i>afa/draBC</i> , <i>iucD</i> , <i>ibeA</i> y <i>tsh</i> en <i>E. coli</i> en función del filogrupo	135
Figura 14. Distribución de serogrupos en aislados de <i>E. coli</i> productores de SHV-12 y CTX-M-15. NT: no tipable; AA: autoaglutinante.....	140
Figura 15. Distribución de serogrupos en <i>E. coli</i> productor de CTX-M-15. NT: no tipable.....	141
Figura 16. Distribución de serogrupos en <i>E. coli</i> productor de SHV-12. NT: no tipable; AA: autoaglutinante.....	142
Figura 17. Comparación de la distribución de serogrupos según el origen de los aislados ECBLEE.....	143
Figura 18. Dendograma obtenido mediante PFGE con <i>XbaI</i> de aislados productores de SHV-12. Entre líneas se muestra la relación clonal entre un aislado de <i>E. coli</i> de origen clínico (nº aislado 362) y otro de origen alimentario (nº aislado 94/7) productores ambos SHV-12 y pertenecientes al filogrupo A1.....	145
Figura 19. Dendograma obtenido mediante PFGE con <i>XbaI</i> de aislados productores de SHV-12 y pertenecientes al filogrupo A1. Entre líneas se muestra la relación clonal entre aislados de <i>E. coli</i> del filogrupo A1 productores de SHV-12.....	145
Figura 20. Dendograma obtenido mediante PFGE con <i>XbaI</i> de de los aislados de <i>E. coli</i> productores de CTX-M-15, filogrupo B2 ₃ . ITU: infección del tracto urinario; HC: hemocultivo.....	146

Figura 21. Dendograma obtenido mediante PFGE con <i>Xba</i> I de aislados de <i>E. coli</i> productores de CTX-M-15, pertenecientes al filogrupa A y ST410.....	147
Figura 22. Dendograma obtenido mediante PFGE con <i>Xba</i> I de aislados ECBLEE. Entre líneas se muestran los dos aislados con un índice de similitud >95%.....	148
Figura 23. Electroforesis de los productos de restricción con S1 de plásmidos portadores de CTX-M-15. Calle M, patrón de peso molecular, <i>S. aureus</i> NCTC 8325 digerido con la enzima <i>Sma</i> I.; calle 1, cepa de <i>E. coli</i> O25:H4-ST131; calle 2, TF113/1; calle 3, TF 113/6; calle 4, aislado no relacionado con el estudio; calle 5, TF281; calle 6, TF 338; calle 7, TF358; calle 8, <i>E. coli</i> J53 sin plásmido.....	149
Figura 24. Restricción de ADN plasmídico digerido con <i>Hpa</i> I (A) e hibridación utilizando como sonda <i>bla</i> _{CTX-M-15} (B) y <i>aac(6')-Ib</i> (C). Calle M, marcador de peso molecular (ADN fago λ digerido con <i>Hind</i> III); calle 1, <i>E. coli</i> O25:H4-ST131, filogrupa B2 ₃ ; calle 2, TF28; calle 3, TC316; calle 4, TF358; calle 5, TF113/6, calle 6, TF113/1; calle 7, TF338.	150
Figura 25. Representación esquemática del entorno genético del gen <i>bla</i> _{CTX-M-15} en aislados de <i>E.coli</i> pertenecientes al filogrupa A1. P: promotor putativo	151
Figura 26. Resistencia a cefalosporinas de tercera generación en aislados de <i>E. coli</i> de hemocultivos en distintos países europeos (2002-2008). (Fuente: European Antimicrobial Resistance Surveillance System-EARSS) PT, Portugal; GR, Grecia; ES, España; GB, Gran Bretaña; DE, Alemania, NL, Holanda; BE, Bélgica; FR, Francia; SE, Suecia	159
Figura 27. Prevalencia de ECBLEE en infecciones nosocomiales y comunitarias en España entre 1995 y 2003. Adaptado de Romero y cols. 2005 (5).	167
Figura 28. Esquema de los puntos críticos de contaminación de la carne por <i>Escherichia coli</i>	171
Figura 29. Representación esquemática del entorno genético del gen <i>bla</i> _{CTX-M-15} de los aislados de <i>E. coli</i> (A) pertenecientes al filogrupa A1 de este estudio, similar a la descrita por Dhanji y cols. en 2011, (B) pertenecientes al clon ST 131, filogrupa B2, más prevalente a nivel internacional (6) y (C) pertenecientes al clon más prevalente en Reino Unido, denominado "cepa A" (7). P: promotor habitual de <i>bla</i> _{CTX-M-15} localizado en <i>ISEcp1</i> en las figuras A y B. En la figura C se observa un promotor alternativo localizado en la IS26.	190
Figura 30. Factores que determinan el riesgo de ingestión de ECBLEE a partir de alimentos cárnicos aviares. Adaptado de Depoorter y cols., 2012 (8)	197
Figura 31. Posibles rutas de transmisión de enterobacterias patógenas y comensales entre animales y humanos. *Uso de antimicrobianos. Tomado de Phillips y cols., 2004 (9).....	198

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, es el comensal más prevalente en el tracto gastrointestinal de humanos y uno de los principales agentes causantes de un amplio espectro de infecciones en humanos, como bacteriemia, infección del tracto urinario, meningitis neonatal o enteritis. En la última década hemos asistido a un incremento significativo de la resistencia de estos microorganismos a diferentes familias de antimicrobianos de uso clínico (multirresistencia), hecho que complica el manejo de estas infecciones. Entre los mecanismos que originan la multirresistencia en *E. coli* destacan las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), enzimas capaces de hidrolizar las penicilinas, las cefalosporinas de amplio espectro y los monobactames. Es frecuente además, que los aislados productores de BLEE muestren resistencia a otras familias de antimicrobianos de amplio uso clínico, como las quinolonas, lo que puede conllevar un retraso en el inicio del tratamiento empírico adecuado y un aumento de la morbimortalidad y los costes asociados. Desde su aparición, la prevalencia de *E. coli* productor de BLEE (ECBLEE) a nivel mundial ha ido en aumento. Adicionalmente, en los últimos años, la epidemiología de las infecciones causadas por ECBLEE ha experimentado cambios significativos, siendo en la actualidad frecuentes los casos de infecciones no solo nosocomiales, sino también comunitarias.

1.1 Antibióticos betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos son agentes bactericidas que ejercen su acción a nivel de la pared celular bacteriana en formación. Son análogos estructurales del aminoácido terminal de las subunidades peptídicas precursoras de la pared de peptidoglicano, lo que facilita su unión de carácter irreversible al sitio activo de las transpeptidasas PBPs (*penicillin binding proteins*), interrumpiendo la síntesis de la pared celular. Hasta hoy se han desarrollado gran cantidad de antibióticos betalactámicos naturales y derivados semisintéticos, que han convertido a esta familia de antimicrobianos en la más utilizada para el tratamiento de las enfermedades infecciosas causadas por enterobacterias.

1.1.1 Penicilinas

Las penicilinas contienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico. La presencia de una cadena lateral

característica en la posición 6 del anillo betalactámico define las propiedades de las distintas penicilinas. Actúan fijándose a las PBP (proteínas fijadoras de penicilina) e inhibiendo con ello la formación del peptidoglucano de la pared bacteriana.

1.1.2 Cefalosporinas

Las cefalosporinas son fármacos cuya estructura básica está constituida por el anillo 7-aminocefalosporánico (fusión de un anillo dihidrotiacínico y un anillo betalactámico) donde la introducción de modificaciones en las cadenas laterales origina las diversas cefalosporinas. Existen en la actualidad cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación, con diferencias tanto en su actividad y farmacocinética como en su espectro de acción (Tabla 1).

Las cefalosporinas de primera generación tienen un espectro de acción similar al de las penicilinas. Son activas frente a *Staphylococcus aureus* resistente a penicilina, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y otros estreptococos aerobios y anaerobios. También tienen actividad frente a algunos aislados de *E. coli*, *Klebsiella* spp., y *Proteus mirabilis*. Entre las de segunda generación encontramos antibióticos orales y parenterales con actividad ampliada frente a diversos microorganismos Gram negativos. Son más activas frente a *E. coli*, *Klebsiella* y *P.mirabilis*, algunos aislados de *Enterobacter* y *Serratia* y ofrecen en general buena cobertura frente a *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp. y muchos anaerobios. Las cefalosporinas de tercera generación son mucho más activas frente a a la familia *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* (en el caso de la ceftazidima) y contra *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae*. Sin embargo frente a cocos Gram positivos pierden actividad respecto a las cefalosporinas de segunda generación. Su amplio espectro de acción radica en su facilidad para atravesar la membrana externa de los microorganismos Gram negativos y, sobre todo, por su resistencia a la acción de las betalactamasas de espectro extendido. Cefepime (cefalosporina de cuarta generación) presenta una elevada penetración intracelular a través de la membrana externa de bacilos Gram negativos, puesto que es un zwitterion. Es activo frente a *P. aeruginosa* y en general frente a la familia *Enterobacteriaceae*, *Proteus* spp., *Providencia* spp. y *Morganella* spp. Además tiene mayor actividad que las de tercera generación sobre estafilococos y estreptococos, pero no es activa frente a enterococos ni anaerobios.

1.1.3 Carbapenemas

Las carbapenemas son los antimicrobianos de mayor espectro de acción y actividad de que disponemos en la actualidad. Están constituidas por un anillo betalactámico fusionado a un anillo pirrolidínico compartiendo un nitrógeno. Distintos tipos de sustituciones en los anillos y en las cadenas laterales llevan consigo cambios en la actividad del antimicrobiano, su potencia y resistencia a la acción de las betalactamasas. Son estables frente a la mayoría de betalactamasas, exceptuando las producidas por *Stenotrophomonas maltophilia* y algunas especies de *Bacteroides fragilis*. Ertapenem, a diferencia de imipenem, meropenem y doripenem, no es activo frente a *P. aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. La resistencia a estos antimicrobianos está mediada principalmente por la producción de carbapenemasas (metalo-betalactamasas) y por la alteración de porinas, que reducen su capacidad de penetración a través de la membrana.

1.1.4 Monobactámicos

Los monobactámicos (aztreonam) son derivados del ácido 3-aminomonobactámico, con una estructura betalactámica sencilla. Aunque son muy parecidos a la penicilina, son los únicos betalactámicos que pueden administrarse en casos de alergia a penicilina por no presentar reacciones de hipersensibilidad cruzada. Está indicado su uso en infecciones causadas por bacterias aerobias Gram negativas y *P. aeruginosa*. Aztreonam no es activo frente a la mayoría de aislados de *Acinetobacter* spp., *Burkholderia cepacia* y *S. maltophilia*.

1.1.5 Inhibidores de betalactamasa

Los inhibidores de betalactamasas pueden ser betalactámicos o no betalactámicos. Entre los primeros se encuentran los empleados en la actualidad como fármacos. El ácido clavulánico está constituido por un núcleo similar al ácido penicilánico de las penicilinas, caracterizado por la sustitución de un átomo de azufre en posición 3 por uno de oxígeno y la ausencia de la cadena lateral acilamino en posición 6. Actúa como un inhibidor "suicida", formando un complejo irreversible con la betalactamasa. Inhibe las betalactamasas de estafilococos y de muchas bacterias Gram negativas, pero no es activo frente a las betalactamasas cromosómicas inducibles tipo AmpC de *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* spp. Sulbactam y tazobactam son sulfonas del ácido penicilánico.

Introducción

Tazobactam se diferencia de sulbactam por la presencia de un grupo tiazol en posición 3.

Penicilinas	Cefalosporinas
Naturales	Primera generación
Bencilpenicilina (penicilina G)	Cefalotina
Fenoximetilpenicilina (penicilina V)	Cefapirina
Semisintéticas	Cefradina
Resistentes a penicilinas	Cefazolina
Meticilina	Cefalexina
Nafcilina	Cefaloridina
Cloxacilina	Cefadroxil
Dicloxacilina	Segunda generación
Oxacilina	Cefaclor
De espectro extendido	Cefamandol
Aminopenicilinas	Cefonicida
Ampicilina	Ceforanida
Amoxicilina	Cefuroxima
Bacampicilina	Cefprozil
Pivampicilina	Loracarbef
Carboxipenicilinas	Cefmetazol
Carbenicilina	Cefotetan
Ticarcilina	Cefoxitina
Ureidopenicilinas	Tercera generación
Azlocilina	Cefdinir
Mezlocilina	Cefditoren
Piperacilina	Cefixime
Combinaciones penicilina+inhibidor de betalactamasa	Cefoperazona
Ampicilina-sulbactam	Cefotaxima
Ticarcilina-clavulánico	Cefpodoxima
Amoxicilina-clavulánico	Ceftazidima
Piperacilina-tazobactam	Ceftibuten
Carbapenemas	Ceftizoxima
Imipenem	Ceftriaxona
Meropenem	Cuarta generación
Ertapenem	Cefepime
Doripenem	Cefpirome
Faropenem	
Panipenem	
Monobactames	
Aztreonam	

Tabla 1. Principales grupos de antibióticos betalactámicos. Tomado de "Manual of Clinical Microbiology" (9th edition) (1)

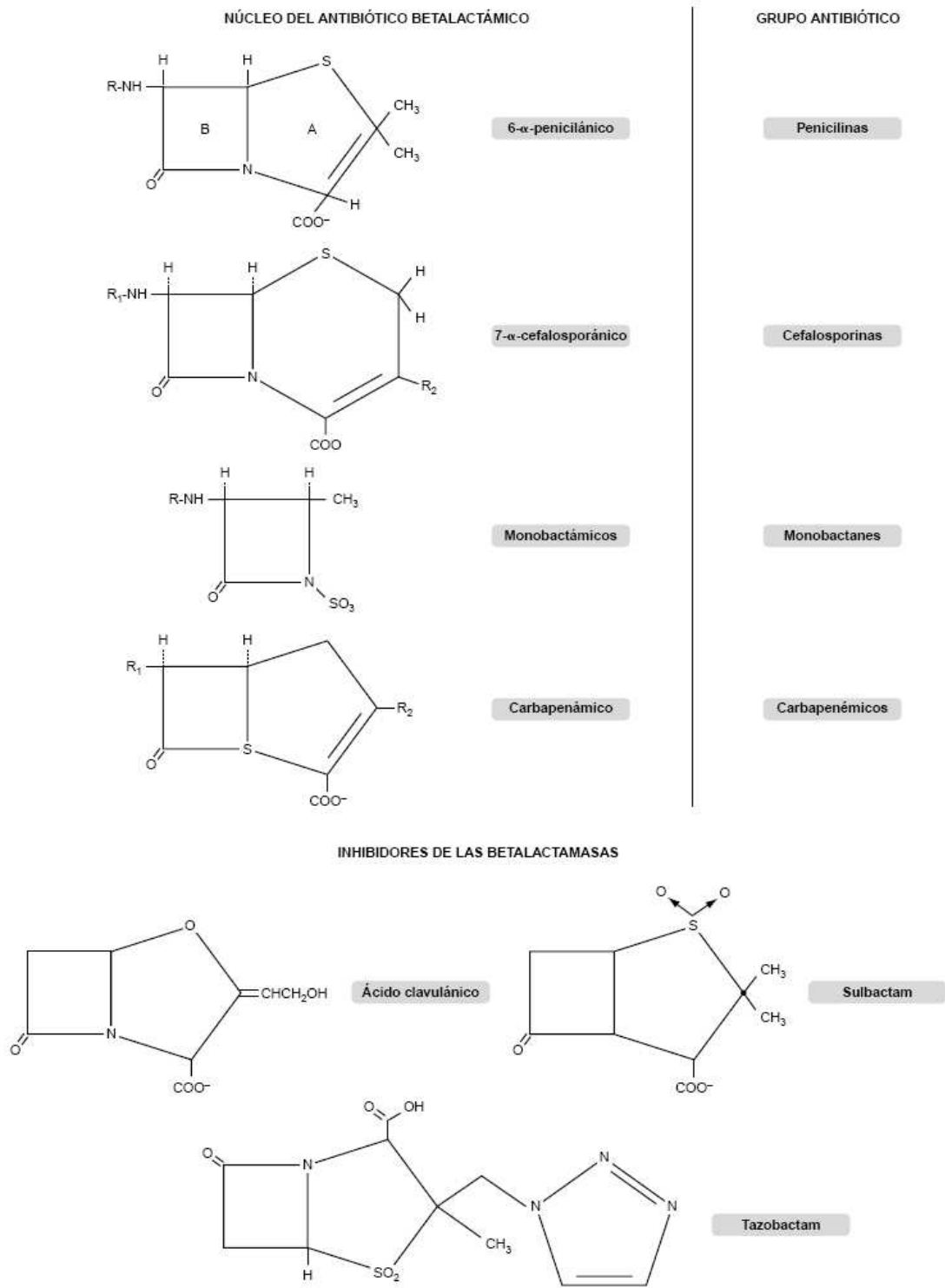


Figura 1. Estructura química de los betalactámicos

1.2 Mecanismos de resistencia a betalactámicos

La resistencia antibiótica puede ser natural (intrínseca) o adquirida. La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteria y esta situación no es variable. La resistencia adquirida es variable y es adquirida por un aislado de una especie bacteriana. Generalmente los determinantes de resistencia codificados en plásmidos, transposones e integrones, pueden transferirse incluso entre distintas especies bacterianas, principalmente por conjugación. Cuando esto ocurre estaremos hablando de resistencia adquirida. También se conoce como resistencia adquirida la aparición de mutaciones en el cromosoma que conllevan el desarrollo de resistencia.

En las bacterias Gram negativas, el mecanismo mayoritario de resistencia a betalactámicos (natural y adquirido) es la hidrólisis enzimática llevada a cabo por las betalactamasas, que pueden estar codificadas en el cromosoma o en plásmidos. En bacterias Gram negativas las betalactamasas se localizan en el espacio periplásmico, entre la pared celular y la membrana celular externa. Los microorganismos Gram positivos liberan las betalactamasas al medio extracelular. La síntesis de estas enzimas puede ser constitutiva o inducible y el nivel de resistencia que generan está directamente relacionado con sus propiedades hidrolíticas, el grado de afinidad por el betalactámico en cuestión y la concentración de las mismas. A su vez, la concentración puede estar condicionada por el número de copias del plásmido codificante, en el caso de que el gen *bla* (que codifica la betalactamasa) no sea de localización cromosómica.

Además de los determinantes genéticos que confieren resistencia, en algunas bacterias defectivas en la función de las autolisinas se observa un fenómeno conocido como tolerancia (10) que permite a la bacteria sobrevivir en altas concentraciones de antibiótico. Se manifiesta como una diferencia entre la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CMB), siendo la CMB muy superior a la CMI.

Otros mecanismos de resistencia a los betalactámicos son los siguientes:

- a. Alteración de la permeabilidad de la membrana externa: Normalmente provocada por mutaciones en las proteínas que forman canales en la membrana.
- b. Alteraciones en las bombas de expulsión: Las mutaciones en proteínas transmembrana que actúan como bombas de expulsión pueden conllevar una ampliación del espectro de moléculas que estas bombas son capaces de reconocer y expulsar de la bacteria.
- c. Alteraciones en la diana del antimicrobiano: Las PBP pueden sufrir pérdidas de afinidad por los betalactámicos a consecuencia de las mutaciones que afectan a su estructura terciaria.

1.3 Betalactamasas: Características y clasificaciones

1.3.1 Caracterización química

Las betalactamasas son enzimas de naturaleza proteica, con una masa molecular de aproximadamente 29 kDa, que hidrolizan el enlace amida del anillo betalactámico de penicilinas y otros betalactámicos, dando lugar a compuestos sin actividad antibacteriana. Estas enzimas parecen haber evolucionado a partir de las PBP con las que tienen cierto grado de homología de secuencia. Esta evolución habría sido favorecida por la presión selectiva ejercida por microorganismos del entorno productores de betalactamasas (11). Desde que Abraham y Chain describieron la primera betalactamasa en 1940 (12) estas enzimas han aumentado en número y se han diversificado de forma alarmante. Por ejemplo, existen en la actualidad más de 300 BLEE descritas (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>)

El mecanismo de acción de las betalactamasas depende de la presencia en su sitio activo de un residuo de serina o de zinc, dependiendo del tipo de enzima. Estos residuos son necesarios para atacar el anillo betalactámico, produciéndose la hidrólisis del mismo mediante la formación de un complejo acil-enzima y posterior rotura del enlace amídico. Las fases de la reacción son:

1. Unión reversible no covalente entre la enzima y el anillo betalactámico.
2. El grupo hidroxilo libre del anillo de serina del sitio activo rompe el anillo formándose un enlace acil covalente.

3. Intervención de un molécula de agua y rotura del enlace acil con la consiguiente liberación del antibiótico inactivo y la betalactamasa activa.

1.3.2 Clasificaciones de las betalactamasas

Desde el punto de vista clínico es muy importante conocer no sólo el tipo de betalactamasa que produce un determinado microorganismo sino también el fenotipo de resistencia que genera, la localización cromosómica o plasmídica y el carácter inducible o constitutivo de su expresión. Muchas de estas características junto con otras como el peso molecular, el punto isoeléctrico y la secuencia de aminoácidos se han utilizado en la elaboración de las diferentes clasificaciones de betalactamasas. La primera clasificación fue realizada por Richmond y Sykes en 1973 (13) e incluía todas las betalactamasas de microorganismos Gram negativos estudiadas hasta ese momento. En 1976 Sykes y Matthew revisaron esta clasificación, que se basaba principalmente en el comportamiento de estas enzimas frente a inhibidores y sustratos (14). Cuatro años más tarde, Ambler y Jaurin establecieron, según las secuencias de aminoácidos de estas enzimas, la clasificación molecular (15) según la cual existen 4 clases de betalactamasas: A, B, C y D. Las de los grupos A, C y D poseen serina en su centro activo y las pertenecientes al grupo B poseen zinc (metalobetalactamasas).

A partir del año 1983, aparecieron en Europa betalactamasas que rompían los criterios de estas clasificaciones y se hizo necesario reagrupar los nuevos datos que iban surgiendo. En 1989 Bush publicó el esquema que, con las subsiguientes actualizaciones, constituye la que es la clasificación más utilizada en la actualidad (tabla 2). El esquema de Bush, Jacoby y Medeiros divide a las betalactamasas en 4 grupos funcionales, integrando propiedades bioquímicas, de estructura molecular y la secuencia nucleotídica (16-18). A pesar lo expuesto, se siguen describiendo betalactamasas cuya inclusión en algún grupo es todavía difícil.

Grupo Bush, Jacoby y Medeiros	Clase Ambler	Centro activo	Tipo de enzima	Sustrato preferido	Inhibidas por		Enzimas representativas
					CLAV	EDTA	
1	C	Serina	Cefalosporinas de espectro ampliado	Penicilinas, cefalosporinas de espectro restringido y extendido, cefamicinas y monobactámicos	-	-	CMY-2 a 13, LAT-1, MOX-1 y 2, FOX 1 a 6, ACT-1, MIR-1, DHA-1 y 2, ACC-1, CFE-1, algunas enzimas cromosómicas de bacterias Gram negativas
2a	A	Serina	Penicilinas	Penicilinas	+	-	Penicilinas de bacterias Gram positivas
2b	A	Serina	Betalactamasas de espectro ampliado	Penicilinas Cefalosporinas 1ª gen.	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Serina	Betalactamasas de espectro extendido	Penicilinas Cefalosporinas 1ª-3ª gen. Monobactámicos	+	-	Numerosas variantes de SHV y TEM, CTX-M, PER, VEB, GES-1, IBC-1
2br	A	Serina	Betalactamasas de espectro extendido resistentes a los inhibidores	Penicilinas, cefalosporinas de 1ª, 2ª y 3ª G (bajo nivel)	-	-	TEM-50 (CMT-1), TEM-68 (CMT-2), TEM-89 (CMT-3)
2c	A	Serina	Penicilinas y carbenicilinas	Penicilinas, carbenicilina	+	-	PSE-1, PSE-3 a 5

2d	D	Serina	Penicilinas de espectro reducido	Penicilinas y cloxacilina	+/-	-	Numerosas variantes OXA
		Serina	Betalactamasas de espectro extendido	Penicilinas, cloxacilina, Betalactámicos de espectro extendido, a veces monobactámicos o Cef. 3ª G	+/-	-	Algunas derivadas de OXA-2 y OXA-10, OXA-18, 29, 30, 31, 32 Y 45
		Serina	Carbapenemasas	Penicilinas, oxacilina y carbapenémicos			OXA-23 a 27, 40, 48, 54
					+	-	
2e	A	Serina	Penicilinas y cefalosporinas	Penicilinas y cefalosporinas 1ª-3ª gen.	+	-	Betalactamasa cormocómica de <i>B. fragilis</i> , <i>B. uniformis</i> , <i>B. vulgatus</i> , <i>C. diversus</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Y. esterocolitica</i> , <i>C. koseri</i> y <i>C. sedlakii</i>
2f	A	Serina	Carbapenemasas	Penicilinas, cefalosporinas 1ª-4ª gen, carbapenémicos	+	-	NMC-A, SME-1 a 3, IMI-1, KPC-1 a 3, GES-2
3	B	Zinc	Carbapenemasa	Penicilinas, cefalosporinas 1ª-4ª gen. y carbapenémicos	-	+	IMP-1 a 13, VIM-1 a 7, SPM-1, algunas enzimas cromosómicas de bacterias Gram negativas (AmpC)
4	NI*	Serina	Penicilinas	Penicilinas	-	-	Enzima cromosómica de <i>Burkholderia cepacia</i>

Tabla 2. Clasificación y propiedades de las betalactamasas según Bush, Jacoby y Medeiros. NI: No incluido

De los distintos grupos de betalactamasas según el esquema de Bush, Jacoby y Medeiros (19), cabe destacar el grupo 2, el más abundante y en el que se incluyen muchas betalactamasas de gran relevancia clínica. Sus características son las siguientes:

Grupo 2

- Es el más abundante y en él se agrupan las betalactamasas pertenecientes a las clases A y D de Ambler.
- Presentan un residuo de serina en el centro activo.
- La mayoría se inhiben por ácido clavulánico.
- La localización de los genes *bla* es plasmídica en la mayoría de los casos.

En función del sustrato hidrolizado se ha dividido en 8 subgrupos:

- **Subgrupo 2a:** incluye penicilinasas mayoritariamente de bacterias Gram positivas.
- **Subgrupo 2b:** incluye a las enzimas capaces de inactivar penicilinas y cefalosporinas (betalactamasas de amplio espectro). Dentro de 2b se diferencian las que presentan un espectro extendido de sustrato o BLEE, que son capaces de inactivar cefalosporinas de tercera generación y monobactames (**2be**) y las enzimas resistentes a inhibidores de betalactamasas (IRT), derivadas de mutaciones puntuales en TEM-1, TEM-2 y más raramente SHV-5 (2br).
- **Subgrupo 2c:** Incluye enzimas que hidrolizan carbenicilinas más eficientemente que benzilpenicilinas.
- **Subgrupo 2d:** Compuesto por betalactamasas con mayor actividad sobre cloxacilina que bencilpenicilina.
- **Subgrupo 2e:** Cefalosporinasas hiperproducibles que hidrolizan monobactames.
- **Subgrupo 2f:** Carbapenemasas con un residuo de serina en el centro activo, que se inhiben por ácido clavulánico.

1.3.2.1 BLEE tipo TEM

TEM-1 es junto con SHV-1 la betalactamasa más frecuentemente descrita en enterobacterias. Es responsable de más del 90% de la resistencia a ampicilina en *E. coli* y podemos encontrarla en multitud de especies bacterianas como *H. influenzae*, *N. gonorrhoea*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*, *M. morganii*, *P. mirabilis* etc. Esta dispersión se ha visto facilitada por su localización en elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones. TEM-2 surge como consecuencia de una mutación en la posición 39 que no altera el perfil de sustrato, sino únicamente el punto isoeléctrico de la enzima (de 5.4 a 5.6). A partir de estas dos enzimas y por distintas mutaciones surgieron las betalactamasas con fenotipo BLEE tipo TEM, siendo TEM-3 la primera descrita en 1988. Glu104Lys y 238Ser son los cambios que la diferencian de TEM-2 y provocan un aumento del punto isoeléctrico hasta 6.3 y la capacidad de hidrolizar cefalosporinas de amplio espectro (20).

En general, las posiciones en que se producen las mutaciones que dan lugar a una nueva BLEE son limitadas y existen posiciones en las que ocurren con mayor frecuencia, como los aminoácidos localizados en el sitio activo de la enzima Ala237 Gly238 y Arg164 y los situados en el lugar de interacción con las cadenas laterales de los oximiino-betalactámicos Glu104 y Glu240 (21, 22). Conllevan generalmente una alteración en la estructura tridimensional de la enzima, afectando principalmente al centro activo y provocando un cambio en el punto isoeléctrico (entre 5.2 y 6.5) y en el perfil de sustrato.

TEM-24 es una de las enzimas más importantes de esta familia de enzimas. Se han descrito brotes por *E. aerogenes* productor de TEM-24 en Francia (23, 24), Italia (25) y España (26). De las betalactamasas tipo TEM derivan también las llamadas IRT (27) o TEM resistentes a inhibidores, que no son inactivadas por inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico o el sulbactam. Estas enzimas, aunque son nombradas como TEM y un número, no son consideradas BLEE, puesto que no tienen actividad frente a cefalosporinas. Se han descrito además, las llamadas CMT (Complex Mutant TEM Enzymes), (28) que comparten características de BLEE e IRT, e igualmente se nombran con las letras TEM más un número. Esta denominación hace referencia a la secuencia aminoacídica de la enzima sin considerar su perfil de sustrato.

1.3.2.2 BLEE tipo SHV

El gen *bla* que codifica SHV-1 se encuentra en el cromosoma de más del 90 % de las cepas de *K. pneumoniae*. Diversas mutaciones en esta enzima han ido conformando una familia muy amplia y diseminada de BLEE. La mutación más frecuente es la sustitución de una glicina por serina en la posición 238, que proporciona a la enzima SHV-2 la capacidad de hidrolizar ceftazidima de forma eficaz. Esta enzima causó el primer brote de microorganismos resistentes a cefalosporinas de tercera generación en España, entre 1988 y 1990 (29). Otro cambio habitual es el de ácido glutámico por lisina en la posición 240, que faculta a la enzima para la hidrólisis de cefotaxima. Portan este cambio aminoacídico enzimas como SHV-5 y SHV-12. SHV-5 fue identificada en Chile en una cepa de *K. pneumoniae* en 1987 (30) y desde entonces se ha diseminado por todo el mundo (31-37). SHV-12 fue descrita por Nuesch-Inderbinen y cols. en 1997 durante la realización de un estudio multicéntrico llevado a cabo en Suiza (38). Se caracteriza por la presencia de una glutamina en la posición 35 (Leu35Gln) y un punto isoelectrico de 8.2 y es una de las BLEE derivadas de SHV-1 más ampliamente distribuidas en la actualidad.

1.3.2.3 BLEE tipo CTX-M

Las BLEE de tipo CTX-M son BLEE ampliamente distribuidas que hidrolizan aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, monobactam y algunas cefalosporinas de amplio espectro como la cefotaxima. Aunque las primeras enzimas descritas se caracterizaban por hidrolizar eficientemente cefotaxima (de ahí su nombre), más tarde surgieron otras variantes con mutaciones puntuales como Pro 167 Ser o Asp 240 Gly que conllevan un aumento de su capacidad de hidrólisis sobre ceftazidima (2). El punto isoelectrico de esta familia de enzimas oscila entre 7.5 y 9 y contienen 2 aminoácidos que parecen jugar un papel fundamental en la resistencia de amplio espectro, Ser 237 y Arg 276. Los microorganismos que expresan estas enzimas son sensibles a los inhibidores de betalactamasas y a carbapenemas.

La familia CTX-M muestra tan sólo un 40% de homología con las betalactamasas de la familia TEM y SHV. Sin embargo, existe una alta homología (mayor del 90%) entre determinados genes del cromosoma de *Kluyvera* y algunos genes *bla*_{CTX-M}, por lo que se piensa que estos genes originarios habrían saltado del cromosoma para integrarse en distintos plásmidos y diseminarse (2). Se han descrito 5 grupos de enzimas CTX-M (tabla 3) y cada uno parece tener orígenes filogenéticos diferentes. Así, el grupo CTX-M-1 parece proceder de la betalactamasa cromosómica

de clase A de *Kluyvera ascorbata*, el grupo CTX-M-2 de la de *K. cryocrescens* y el grupo CTX-M-8 de *K. georgiana*. En el año 2005, Olson y cols. encontraron un gen en el cromosoma de *K. georgiana* que es idéntico al gen *bla*_{CTXM-14}, por lo que el origen de las BLEE del grupo CTX-M-9 podría encontrarse en esta especie (39).

Aunque en otras zonas del mundo predomina CTX-M-15, en España las enzimas más abundantes de esta familia son CTX-M-9 y CTX-M-14, aunque la proporción de CTX-M-15 ha ido en aumentando en los últimos años. Ambas se han descrito además en otros países tan distantes como Francia, China o Brasil (40-42). Sabaté y cols. clonaron y secuenciaron CTX-M-9 por primera vez en el año 2000 (43). CTX-M-14 es una variante que se diferencia de CTX-M-9 por la sustitución Ala 231 Val.

Grupo	Enzimas integrantes
CTX-M-1	CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -22, -23, -28, -29, -30, -32, -33, -34, -36, -37, -42, -44 y -54.
CTX-M-2	CTX-M-2, -4, -4L, -5, -6, -7, -20, -31, -35 y -43.
CTX-M-8	CTX-M-8 y -40.
CTX-M-9	CTX-M-9, -14, 16, -17, -18, -19, -21, -24, -27, -38, -45, -46, -47, -48, -49, -50.
CTX-M-25	CTX-M-25, -26, -39 y -41.

Tabla 3. Clasificación de las BLEE tipo CTX-M en función de su secuencia aminoacídica. Modificado de Bonnet y cols., 2004. (2)

1.3.2.4 BLEE tipo OXA

Pertenecen a la clase molecular D y al grupo funcional 2d. Confieren resistencia a penicilinas y cefalosporinas y deben su nombre a que presentan una alta capacidad de hidrólisis de oxacilina y cloxacilina. Su grado de inhibición por ácido clavulánico es variable.

1.3.2.5 Otras BLEE

Aunque la mayoría de BLEE de aislamientos clínicos pertenecen a las familias TEM, SHV y CTX-M, existen otras BLEE como las de los tipos PER (*Pseudomonas* extended resistance), VEB (Vietnam Extended-spectrum betalactamase), CME (*Chryseobacterium meningosepticum*), TLA (Tlahuicas, tribu india), SFO (*Serratia fonticola*), BES (Brasil Extended Spectrum) y la familia GES/IBC, que son

características de regiones concretas y que se agrupan en las clases moleculares A y D.

1.3.3 Dispersión de los genes *bla*.

La difusión de un fenotipo de resistencia en un período relativamente corto de tiempo en un lugar concreto se asociaba, hasta hace poco tiempo, a la expansión clonal de una cepa que portaba los genes responsables de ese fenotipo resistente. Esto era cierto en los primeros brotes causados por *K. pneumoniae* productor de BLEE, principalmente de tipo TEM y SHV (44-46). Hoy en día, y con la aparición y dispersión de las nuevas familias de betalactamasas, hemos observado como existen muchos casos en los que en un brote localizado están implicadas distintas cepas del mismo microorganismo, con escasa o ninguna relación clonal, pero que expresan la misma BLEE. Esto se explica por la presencia de elementos genéticos móviles de transmisión horizontal entre diferentes clones, ya sean plásmidos, secuencias de inserción, transposones o integrones. Esto no excluye que sigue existiendo diseminación clonal de cepas de *K. pneumoniae* (a nivel hospitalario sobre todo) y de *E. coli* (como es el caso del complejo clonal ST131, sobre todo en la comunidad) productoras principalmente de enzimas CTX-M.

Las construcciones genéticas que albergan los genes *bla* pueden ser variadas para la misma familia y el mismo tipo de enzima en una misma especie de microorganismo. Además, estas estructuras pueden ser extremadamente complejas, con distintos elementos genéticos móviles o parte de ellos integrados en otros (por ejemplo un integrón dentro de un transposón, portado todo por un plásmido) y además pueden evolucionar con el tiempo a consecuencia de nuevos procesos de movilización, inserción, delección, etc. La facilidad con que un elemento genético móvil puede transferirse entre especies distintas de microorganismos, ha propiciado la rápida dispersión de las BLEE a nivel mundial en los últimos años.

Los plásmidos portadores de BLEE pertenecen a diversos grupos de incompatibilidad en entre los que se encuentran con más frecuencia FII, A/C, L/M, N, I1 y K (47, 48). Algunos plásmidos con alta capacidad de transmisión, como los pertenecientes a los grupos IncFII portadores de CTX-M-15 o los del grupo IncI1 están ampliamente diseminados en poblaciones de *E. coli* tanto de origen humano como de origen animal y podemos profundizar en el análisis de la evolución de los mismos mediante las técnicas de subtipado disponibles (49, 50).

Las secuencias de inserción (IS) son los elementos genéticos móviles más sencillos y presentan en ambos extremos una secuencia repetida invertida (IR). Pueden contener una o varias pautas de lectura abierta (ORFs). Es característica la presencia de IS26 en el entorno genético de *bla*_{SHV}, a través de la cual se han movilizadado desde el cromosoma de *K. pneumoniae* las BLEE tipo SHV (3, 51) y la presencia de *ISEcp1* e *ISCR1* asociados a genes *bla*_{CTX-M14} y *bla*_{CTX-M-9} (52).

Los transposones son estructuras genéticas que se mueven por el genoma a través de un mecanismo de recombinación no homóloga, pero sí reconocen secuencias específicas de recombinación.

- Transposones de clase 1 o compuestos: Flanqueados por IS iguales o similares, que pueden estar orientadas en la misma dirección o estar invertidas y donde una de las IS codifica una transposasa (recombinasa). Entre ambas se localizan distintos genes como los determinantes de resistencia a antimicrobianos.
- Transposones de clase 2 o no compuestos: Tienen IR (repeticiones invertidas) en sus extremos y entre ellas se localizan los genes de la transposasa (*tnpA*), resolvasa (*tnpR*) y genes de resistencia.

En los integrones la integración se produce por un mecanismo de recombinación específica de sitio. Para ello, los integrones cuentan con:

- El gen *intI*, que codifica una integrasa.
- La secuencia *attI*, sitio para la integración del cassette (genes incorporados) y reconocimiento de la integrasa.
- Un promotor común, que regula la transcripción de los cassettes.

Los cassettes cuentan con una secuencia llamada *attC*, que es una repetición que flanquea el cassette y actúa como lugar de reconocimiento de la integrasa y por tanto permite la escisión de los genes y la posterior integración en *attI*.

1.4 Método de detección de BLEE con inhibidores

El primero de estos métodos fue descrito por Jarlier y cols. en el año 1988 (53). En el centro de una placa de agar Mueller-Hinton inoculada con una suspensión bacteriana con un patrón de turbidez ajustado al 0,5 de McFarland, se coloca un disco de amoxicilina o ticarcillina con clavulánico. Alrededor de este, y a 30 mm de distancia, poner discos que contengan distintos betalactámicos (tabla 4). Tras incubar 18-24 horas a 37 °C, una inhibición o agrandamiento del halo de inhibición alrededor de los discos de betalactámicos indicaría la producción de BLEE. Posteriormente surgieron modificaciones para aumentar la sensibilidad de la prueba como reducir la distancia entre discos a 20 mm (54).

Antimicrobiano (carga)	Resultado (diámetros mayores indican posible producción de BLEE)
Cefpodoxima (10 µg)	≤ 17 mm
Ceftazidima (30g)	≤ 22 mm
Aztreonam (30g)	≤ 27 mm
Cefotaxima (30g)	≤ 27 mm
Ceftriaxona (30g)	≤ 25 mm

Tabla 4. Antimicrobianos recomendados para llevar a cabo el despistaje de producción de BLEE en cepas de *E.coli* e interpretación de los resultados. Tomado del documento M100-S19, Vol 29 Nº 3, apéndice A, del CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute); (55)

En caso de que la prueba indique la posible producción de BLEE por parte de la bacteria, las pruebas confirmatorias pueden hacerse mediante microdilución o difusión en agar, según recomendaciones del CLSI (55). En cualquiera de los dos casos, siempre han de usarse cefotaxima y ceftazidima solas (30 µg por disco cuando se emplee esta metodología) y en combinación con ácido clavulánico (30/10 µg). Un incremento de 5 mm en diámetro en el halo de inhibición del crecimiento de cualquiera de las cefalosporinas con inhibidor de betalactamasa respecto al de la cefalosporina sola es confirmatorio. En el caso de la microdilución, debe observarse una disminución de ≥ 3 diluciones dobles (por ejemplo de 8 a 1 µg/ml) en la CMI cuando la cefalosporina está combinada con clavulánico.

También puede detectarse la producción de BLEE mediante la prueba de Epsilon Test, que se realiza sobre agar con tiras de material plástico que contienen en un extremo una cefalosporina de tercera generación y en el otro una combinación

de la misma con ácido clavulánico, ambas en gradiente de concentraciones predefinidas.

Actualmente está generalizado el uso de sistemas automatizados para la evaluación de la sensibilidad a antimicrobianos que tienen la capacidad de detectar la producción de BLEE mediante microdilución. Para ello constan de pocillos que combinan cefalosporinas como cefotaxima y ceftazidima solas y combinadas con un inhibidor de betalactamasas.

1.4.1 Dificultad de detección

La expresión constitutiva de una betalactamasa cromosómica de tipo AmpC puede a menudo enmascarar la presencia de una BLEE. Aunque cada vez son más los laboratorios que aplican técnicas para determinar la presencia conjunta de estas dos enzimas, no existen recomendaciones específicas del CLSI o EUCAST (European Committee for Antimicrobial Suscetibility Testing) al respecto. Fenotípicamente podemos diferenciarlas porque AmpC no es sensible a inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico. Otros marcadores frecuentemente utilizados en el laboratorio para identificar la expresión de AmpC son la resistencia a cefoxitina y su menor actividad sobre cefepime. Cuando los dos tipos de enzima se expresan conjuntamente en un microorganismo se puede utilizar medio MH con cloxacilina a una concentración 200 µg/ml en lugar del agar MH habitual para realizar la técnica de confirmación de producción de BLEE mediante doble disco (56). La cloxacilina tiene la propiedad de inhibir la acción de AmpC, con lo que el microorganismo pierde la resistencia al inhibidor de betalactamasa y se puede medir el efecto de este en combinación con las cefalosporinas, determinando así la producción de BLEE.

El efecto del tamaño del inóculo es relevante, puesto que altera la CMI obtenida. Cuando una bacteria que produce una enzima que degrada un antibiótico muere simultáneamente por la acción de este, podría liberar grandes cantidades de enzima al medio. Este hecho reduciría la concentración del antibiótico en el medio adyacente y aumentaría la CMI. Adicionalmente, la utilización de inóculos bajos pueden dar falsos negativos en la detección de la producción de BLEE (57-59).

En relación con lo anteriormente expuesto, las guías publicadas por "Clinical and Laboratory Standard Institute" (CLSI), señalaban antes de 2010 la necesidad de realizar despistaje fenotípico de la producción de BLEE en *Enterobacteriaceae* con

puntos de corte específicos. Además, se debían informar como resistentes a penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos, los aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE, independientemente de los resultados obtenidos in vitro (55). El EUCAST recomendaba modificar los resultados de sensibilidad/sensibilidad intermedia a sensibilidad intermedia/resistente (60). En el año 2010 estos comités modificaron los puntos de corte de muchas cefalosporinas y aztreonam (61, 62), basándose en los resultados de estudios de farmacocinética/farmacodinámica, datos clínicos y distribuciones de CMI. Con la aplicación de estos puntos de corte inferiores, se eliminó la recomendación anterior de modificar la interpretación de los resultados de sensibilidad obtenidos in vitro. Aun así, se ha mantenido la recomendación de detectar las BLEE por interés epidemiológico (63, 64). En el caso de *E. coli*, y para el método de difusión con discos en agar Mueller Hinton (MHA), utilizado en este trabajo, se han seguido las recomendaciones el uso de los antimicrobianos cefpodoxima, ceftazidima, aztreonam, cefotaxima o ceftriaxona para realizar la prueba de despistaje (55).

1.5 Origen y evolución de las betalactamasas de espectro extendido

Las primeras BLEE descritas derivan de betalactamasas con actividad fundamentalmente penicilinasa e inhibidas por ácido clavulánico como TEM-1, TEM-2 y SHV-1. El hecho de que el espectro de acción de estas betalactamasas hubiera aumentado hasta incluir a las cefalosporinas de tercera generación hizo que se las denominara betalactamasas de espectro ampliado. Ya en el año 1989 se adoptó el término BLEE para referirse a estas enzimas (65).

La primera betalactamasa plasmídica con fenotipo BLEE descrita fue SHV-2. Se encontró en una cepa clínica de *Klebsiella ozaenae* en el año 1983 en Alemania (66). En 1984 se aislaron en Francia cepas de *K. pneumoniae* con un fenotipo similar originado por una variante de TEM-2, denominada inicialmente CTX-1 y posteriormente TEM-3, que incluía 2 mutaciones en su secuencia y podía transferirse mediante ensayos de conjugación (67). En los años siguientes se produjeron brotes epidémicos causados por este microorganismo en Francia, donde el primer gran brote nosocomial documentado afectó a 54 pacientes de 3 unidades de cuidados intensivos en el años 1986 (44, 46, 53, 67). Generalmente se trataba de pacientes de Unidades de Cuidados Intensivos u otras unidades de atención médica especializada. En estas unidades, donde la presión antibiótica es muy alta, se seleccionan fácilmente los microorganismos más resistentes.

En 1986 en Japón, Matsumoto y cols. describieron una BLEE diferente a TEM y a SHV en un aislado de *E. coli* procedente de la flora fecal de un perro que era utilizado en el laboratorio para estudios de farmacocinética de betalactámicos (68). Esta enzima fue denominada FEC-1 y, según los análisis posteriores de su secuencia, difería tan sólo en 2 aminoácidos de CTX-M-3. La primera BLEE a la que se asignó el nombre de CTX-M se describió en 1989 en Alemania en un aislado de *E. coli* y fue denominada CTX-M-1, ya que hidrolizaba cefotaxima. Al mismo tiempo, en Argentina, se producía una rápida diseminación de *Salmonella typhimurium* resistente a cefotaxima, causando infecciones de gravedad de humanos. Se le asignó el nombre de CTX-M-2, pues tenía un perfil de actividad similar a CTX-M-1, incluso con mayor actividad que ésta sobre cefotaxima. Se diferenciaban en su punto isoelectrico (7.9 de CTX-M-2 frente a 8.9 de CTX-M-1) y en una mayor resistencia de CTX-M-2 a los inhibidores de betalactamasas (69). En 1992 se describió en un paciente italiano hospitalizado en Francia una enzima de características similares que se denominó MEN-1 y que poseía menos del 40% de identidad con TEM Y SHV. Esta enzima fue la primera BLEE de transmisión plasmídica no TEM no SHV secuenciada (70). Cuatro años después, se publica la secuencia de una enzima con un 83% de homología con MEN-1, a la que llamaron Toho-1, procedente de un paciente japonés (71). Estudios posteriores determinaron que MEN-1 y CTX-M-1 eran la misma enzima y que Toho-1 era idéntica a la betalactamasa descrita en Argentina CTX-M-2. Desde entonces, la familia CTX-M ha crecido y se ha diseminado a nivel mundial entre multitud de especies bacterianas, principalmente de la familia *Enterobacteriaceae*.

En España, los primeros aislados con BLEE, se detectaron en el año 1988 en dos hospitales de Madrid, el Ramón y Cajal y el Hospital Clínico. Se trataba de aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de SHV-2 (29). En 1998 se publica el brote ocurrido unos años antes en el Hospital de Bellvitge de Barcelona, causado por una cepa de *K. pneumoniae* productora de SHV-5 (45). Entre 1996 y 2000 se describen por primera vez en España aislados de *E. coli* y *Salmonella* spp. productores de CTX-M-9 (43, 72). En 1997 se describe en Madrid el aislamiento de *E. coli* productor de CTX-M-10 (73) aunque según estudios retrospectivos posteriores ya estaba presente en 1990 en *K. pneumoniae* y en 1991 en *Enterobacter* spp. y *Citrobacter freundii* (74-76). En Sevilla se estudió la evolución de los microorganismos productores de BLEE entre 1995 a 2002 en nuestra área sanitaria, que atiende a 500000 habitantes aproximadamente. Entre 1995 y 1998 solamente se registraron 14 aislados de ECBLEE. En el año 2000 y sólo durante ese año el número aumentó a 53, cifra que se duplicó tan sólo 1 año después (5).

1.6 Estructura poblacional de *Escherichia coli*. Filogenia y virulencia

E. coli es un microorganismo que forma parte de la flora habitual del intestino humano, de mamíferos y aves. Sin embargo, también puede causar infecciones intestinales y extraintestinales. Diversos factores dependientes del hospedador y de la bacteria pueden determinar que esta última se comporte como un microorganismo patógeno o comensal. Para el estudio de la diversidad genética de *E. coli* se han utilizado 4 técnicas principales a lo largo del tiempo. El serotipado, basado en la combinación de 173 antígenos O (somático), 80 antígenos K (capsular) y 56 antígenos H (flagelar), la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), el MLST (multi locus sequence typing) y la determinación del grupo filogenético. La aplicación de los últimos métodos de tipado junto a la determinación del perfil de genes de virulencia, han hecho posible el análisis y seguimiento de la dispersión de clones y complejos clonales de alto riesgo epidemiológico asociados a virulencia y multirresistencia antibiótica.

En *E. coli*, como en otros microorganismos, la expresión de factores de virulencia (FV), como adhesinas, toxinas, quelantes de hierro, etc., va a facilitar que se inicie una infección del huésped. Por otro lado, el grupo filogenético al que pertenece *E. coli* también parece estar relacionado con su capacidad infectiva. En 1990, Herzer y cols. (77) elaboraron un sistema de clasificación de *E. coli* basándose en los resultados de un estudio hecho con una colección de cepas de referencia. Mediante el análisis de los patrones de movilidad electroforética (MLEE) de un grupo de enzimas metabólicas establecieron la existencia de 4 filogrupos principales dentro de esta especie: A, B1, B2 y D. Una década después, Clermont y cols. publicaron un método de PCR, vigente en la actualidad, para amplificar un conjunto de 3 marcadores moleculares que permitían asignar rápidamente un aislado de *E. coli* a un grupo filogenético determinado (78). La concatenación de las secuencias de genes individuales obtenidas con la técnica de MLST identifica igualmente estos grupos filogenéticos principales.

Diversos estudios, como el que realizaron Picard y cols. a finales de los años 90 (79), han estudiado la relación existente entre la filogenia y virulencia en *E. coli*. Este autor encontró que los aislados procedentes de muestras fecales de personas sanas pertenecían con menos frecuencia a los filogrupos D y B2 que los procedentes de aislados causantes de infección. En general, se acepta que los aislados comensales pertenecen a los grupos filogenéticos A y B1 y carecen de los factores de

virulencia presentes en los aislados patógenas intestinales y extraintestinales y que los aislados ExPEC (*E. coli* patógeno extraintestinal) (80) se asocian principalmente al filogrupos B2 y en menor medida al D (79, 81). Cabe señalar, a pesar de lo anteriormente expuesto, que un aislado de *E. coli* que cause una infección extraintestinal no tiene por qué ser ExPEC. Se define como ExPEC aquel aislado de *E. coli* que ha demostrado su virulencia en un modelo animal o porta factores de virulencia reconocidos como extraintestinales (80). Sin embargo, este último criterio no está bien establecido y existen distintas opiniones sobre el conjunto de genes codificantes de FV que definen el patotipo ExPEC (80, 82, 83).

El nivel de resistencia a antimicrobianos, según algunos autores, parecía estar inversamente relacionado con la virulencia. Los resultados de diversos trabajos de investigación sugieren que los aislados causantes de infecciones ExPEC resistentes a quinolonas son menos virulentos que los sensibles (84, 85). En este sentido, Johnson y cols. (86) encontraron diferencias entre los filogrupos y los genes de virulencia de aislados de *E. coli* sensibles y resistentes a fluorquinolonas causantes de ITU. Entre los aislados resistentes a fluorquinolonas eran predominantes los filogrupos A (38%) y B1 (38%), seguidos del D (25%). No encontraron ningún aislado perteneciente al filogrupos B2. Sin embargo, entre los aislados sensibles a fluorquinolonas, el porcentaje de aislados pertenecientes al filogrupos B2 se incrementó hasta el 25%.

1.7 Epidemiología actual de las enterobacterias productoras de BLEE

Desde finales de los 90 hasta hoy, la situación epidemiológica ha cambiado en España y en el resto del mundo. Se ha constatado un aumento en la producción de BLEE por otras enterobacterias como *Salmonella*, *Proteus*, *Morganella* y fundamentalmente *E. coli* (87). Las enzimas de la familia CTX-M se han dispersado a nivel mundial, entre distintas enterobacterias, pasando a ser las BLEE más abundantes en Europa, Canadá y Asia (2, 88, 89). En muchos países asiáticos, donde la situación es endémica, la prevalencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE alcanza cifras alarmantes. En Tailandia, es un estudio realizado en Bangkok entre 2004 y 2005, se estimó en 13,2% y el 12,7% la prevalencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE entre los casos de infección nosocomial, siendo en ambos casos CTX-M la enzima predominante (>99% de los casos) (89). En un estudio realizado en el norte de India sobre aislamientos del año 2006 (90), se encontró que más del 60 % de los aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* expresaban una BLEE, que resultó ser de tipo CTX-M mayoritariamente (85% de los casos). En

EEUU cada vez es más frecuente la descripción de casos que indican que las enzimas CTX-M han emergido también allí en *E. coli* y en otras especies de enterobacterias. En un estudio llevado a cabo en Texas se determinó que en el año 2000 ya existían casos de infección por *E. coli* productor de CTX-M y que 4 años después esta enzima era la más prevalente (91).

Diversos trabajos de seguimiento epidemiológico han puesto de manifiesto que el cambio se produjo en nuestro país a finales de los años 90. Además de incrementarse el número de aislados de *E. coli* productor de CTX-M, se observó que no suelen asociarse a epidemias y que a veces producen más de una enzima (5). En un estudio multicéntrico español que analizaba datos de hospitales de todo el país en el año 2000 se mostró una prevalencia de cepas de *K. pneumoniae* y ECBLEE de 2,7 y 0,5 % respectivamente. Como era de esperar, las cepas de *K. pneumoniae* eran de origen nosocomial en su gran mayoría y las de *E. coli* se aislaron en la mitad de los casos de pacientes extrahospitalarios, si bien en este estudio no se recogieron datos sobre la posible relación con la atención sanitaria de estos casos y no es posible establecer cuáles de estos casos fueron estrictamente comunitarios (92). En 2009 se publicaron los resultados de un segundo estudio multicéntrico español que recoge datos de 2006 (93). El porcentaje de aislados de *K. pneumoniae* BLEE se había multiplicado por 2 y el de ECBLEE por 8 (5,04 y 4,04 % respectivamente). El 67,2 % de los aislados de ECBLEE procedían de muestras de pacientes extrahospitalarios, aunque de este grupo el 53,1% por ciento tuvo alguna relación con la atención sanitaria. Del total de ECBLEE, un 31,5 % se clasificaron como casos estrictamente comunitarios. Entre los casos de bacteriemia por *E. coli*, el 8,8% fueron causados por ECBLEE y dentro de este grupo el 51% eran pacientes extrahospitalarios y el 19% casos de adquisición estrictamente comunitaria.

En relación con los datos anteriores, otro cambio significativo en la epidemiología de las infecciones por ECBLEE es el aumento del número de casos comunitarios, en pacientes no ingresados e incluso sin relación previa con la asistencia sanitaria (94-96). En general se consideran casos comunitarios aquellos en los que los pacientes infectados no han sido hospitalizados en los meses previos (entre uno y doce meses, según criterio de distintos autores) y además en el momento de la toma de muestra su estancia hospitalaria es inferior a 48 horas. El que fue probablemente el primer caso de adquisición comunitaria de ECBLEE se produjo en Irlanda en 1998, aunque no llegó a determinarse el tipo de enzima. Se trataba de un paciente de edad avanzada, con ITU por *E. coli* resistente a ácido

nalidíxico. El paciente no tenía historia previa de ingresos pero sí de tratamiento con antimicrobianos (97). En España, aproximadamente la mitad de los casos de infección por ECBLEE afectan a pacientes no hospitalizados siendo la ITU el tipo más frecuente de infección (5, 7, 98-100).

La variabilidad puede ser alta dentro de un mismo país o incluso en una misma ciudad. En España, un estudio multicéntrico realizado en 2006 mostró una prevalencia media de producción de BLEE del 5.2 % entre los aislados causantes de infección urinaria (101), pero encontramos una horquilla que abarca desde el 0.8 % de Galicia hasta el 18.4 % registrado en la Comunidad Valenciana.

Otros tipos de enzimas no TEM no SHV, han sido descritas en algunos países de Europa, como PER, GER, IBC o ciertas variantes de la familia OXA (87). Además han aparecido nuevas betalactamasas que confieren resistencia a carbapenemas, como las metalobetalactamasas y carbapenemasas y a las cefamicinas, como CMY. Estas nuevas enzimas aparecen frecuentemente asociadas a las BLEE lo que agrava aún más el complicado manejo terapéutico de los pacientes.

Se ha propuesto que el origen del incremento de infecciones por enterobacterias productoras de BLEE de origen nosocomial y comunitario podría tener su origen precisamente en la comunidad. Algunos estudios han mostrado un aumento en la prevalencia de portadores fecales de enterobacterias productoras de BLEE en la comunidad. En Barcelona se demostraron cifras del 2,1% entre febrero y mayo de 2001, del 3,8% entre abril y junio de 2002 y del 7,5% en octubre de ese mismo año (102). En Zaragoza se pasó del 2,5% en 2002 al 7,2% en 2004 (102, 103). En un estudio reciente llevado a cabo en Sevilla para determinar los factores de riesgo para ser portador de ECBLEE, se determinó que el 67,9% de los pacientes comunitarios con ITU por ECBLEE eran además portadores. En este estudio se investigó también si los familiares convivientes y no convivientes de los pacientes tenían más probabilidades de estar colonizados. Un 27,4% de los convivientes y 15,6% de los familiares no convivientes resultaron ser portadores, mientras que en el grupo control (pacientes atendidos en el área de urgencias, escogidos al azar), este porcentaje era sólo del 7,4%. En el análisis multivariante se determinó que ser familiar de uno de estos pacientes incrementaba el riesgo de ser portador fecal de ECBLEE (104). En los estudios en los que se ha realizado la caracterización molecular de la BLEE, las enzimas detectadas en los portadores eran mayoritariamente similares a las que se detectan en los hospitales, lo que apoya la teoría de la entrada

de las BLEE desde la comunidad. En el momento en el que se llevó a cabo este trabajo de tesis doctoral, había poca información disponible sobre el posible papel que podría jugar la cadena alimentaria en la epidemiología de las infecciones por ECBLEE. Si los animales destinados al consumo humano son portadores de ECBLEE, hecho al que apuntaban algunos trabajos en ese momento, los alimentos derivados de ellos podrían resultar contaminados por estas bacterias. Así, el consumidor final podría resultar expuesto a estos microorganismos multirresistentes, de la misma manera en la que resulta expuesto ocasionalmente a otras bacterias zoonóticas. Este hecho estaría en concordancia con el aumento de infecciones observado en la comunidad y con el hecho de que sea más frecuente la colonización intestinal de los individuos convivientes con un portador o infectado por ECBLEE. Por lo tanto, es necesario que se profundice en el estudio de la posible colonización de alimentos por ECBLEE

El incremento en el uso de antibióticos en humanos y animales, la contaminación cruzada en el entorno hospitalario, la importación y exportación de alimentos y los movimientos migratorios podrían haber contribuido igualmente a la diseminación de las BLEE fuera de los hospitales, aunque el papel que ha jugado cada uno de estos factores puede ser variable y estar ligado a contextos epidemiológicos específicos.

Publicaciones recientes apuntan a un aumento en la prevalencia de infecciones comunitarias originadas por *E. coli* productor de SHV-12. La gran dispersión de las enzimas de la familia CTX-M y la reciente aparición y dispersión a nivel mundial de un clon epidémico (O25:H4-ST131 productor de CTX-M-15) puede estar enmascarando la importancia de esta enzima. La epidemiología de *E. coli* productor de SHV-12 no parece mostrar diferencias importantes respecto a la de *E. coli* productor de CTX-M y al parecer también está diseminándose en la comunidad (105). En un estudio de Mulvey y cols. realizado en Canadá en 2004, se encontró que hasta el 39% de las BLEE expresadas por los aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* de 12 hospitales participantes eran SHV-12 (106).

En España es destacable el aumento de la prevalencia de SHV-12 en los últimos años. En un estudio multicéntrico de cohortes, que incluía los casos de infección comunitaria causada por ECBLEE, se encontró que SHV era la BLEE expresada en el 32% de los 112 aislamientos estudiados. Dentro de este grupo de aislamientos que producían SHV, el 86% fueron caracterizadas como SHV-12 (105).

Además en nuestro país se ha descrito la presencia de esta enzima en aislamientos procedentes de animales con infección por *E. coli* (107, 108), lo que justifica de nuevo la necesidad de realizar investigaciones que determinen si existe una relación epidemiológica entre las infecciones en humanos por ECBLEE y su presencia en los animales destinados al consumo humano y los productos alimenticios que consumimos.

Como se ha comentado, en los últimos años se ha diseminado rápidamente a nivel mundial un clon epidémico de *E. coli* portador de *bla*_{CTX-M-15} perteneciente al grupo filogenético B2 y altamente virulento (109, 110). CTX-M-15, descrita por primera vez en 2001 (111), se diferencia de CTX-M-3 en sólo un aminoácido (sustitución de aspartato por glicina en la posición 240 que incrementa su eficiencia hidrolítica sobre ceftazidima. El gen *bla*_{CTX-M-15} se localiza habitualmente dentro de una región denominada MDR (multidrug resistance region) que se caracteriza por poseer diferentes determinantes de resistencia a antimicrobianos como *aac* (6')-Ib-cr, *tetA*, *bla*_{TEM-1} y *bla*_{OXA-1}. La súbita emergencia de este clon y su rápida diseminación tanto en el entorno hospitalario como en la comunidad constituyen en estos momentos un problema de salud pública prioritario.

1.7.1 Factores de riesgo para la infección por enterobacterias productoras de BLEE

Son muchos los trabajos de investigación publicados sobre las variables asociadas a la infección por microorganismos productores de BLEE. Sin embargo los resultados no identifican siempre los mismos factores de riesgo. La metodología empleada por los distintos autores o las diferencias en las políticas de prescripción de antimicrobianos pueden explicar tales diferencias. No obstante, el uso de antimicrobianos que pueden coseleccionar enterobacterias productoras de BLEE, como las quinolonas y las cefalosporinas, la edad y la presencia de comorbilidades aparecen con mucha frecuencia ligado a los casos comunitarios.

En Sevilla, Rodríguez-Baño y cols. llevaron a cabo el primer estudio de casos y controles para determinar los factores de riesgo para la infección comunitaria por ECBLEE. La diabetes, edad avanzada, ITU recurrente, ingresos previos y tratamientos anteriores con quinolonas, resultaron ser factores de riesgo independientes (98). En un estudio posterior realizado por el mismo autor a nivel nacional se encuentran factores de riesgo similares, además del sexo femenino, procedimiento invasivos de

la vía urinaria, seguimiento ambulatorio tras el alta y tratamiento previo con aminopenicilinas, cefalosporinas y fluorquinolonas (100). Ben-Ami y cols. Llevan a cabo un estudio a nivel multinacional y reportan que los factores de riesgo para la infección por enterobacterias productoras de BLEE en pacientes no hospitalizados eran similares entre los diferentes centros: administración previa de antibióticos, residir en centros de larga estancia (residencias de mayores, etc.), hospitalización previa reciente, edad ≥ 65 años y sexo masculino (94). En 2010 se publican los resultados de un trabajo que evaluaba los factores de riesgo asociados con bacteriemia de origen comunitario. La atención sanitaria, ser portador de catéter urinario y la administración previa de antimicrobianos resultaron identificados como factores de riesgo independientes (112). En otro trabajo publicado por Colodner y cols. se encontró una variedad aún mayor de factores predisponentes que en el caso anterior. El hecho de haber estado ingresado en los tres meses previos al momento de la infección, haber recibido tratamiento antibiótico en ese periodo, ser diabético, varón y mayor de 60 años, haber tenido una infección previa por *K. pneumoniae* y haber recibido tratamiento antimicrobiano con cefalosporinas de amplio espectro, quinolonas o penicilina, se asociaron con mayor riesgo de adquirir infección por microorganismos productores de BLEE (113). El hecho de que la hospitalización previa aparezca en algunos estudios como factor de riesgo para tener una infección de origen comunitario no debe interpretarse con una adquisición nosocomial del microorganismo, aunque podría ser cierto en el caso de *K. pneumoniae*. En los aislamientos de *E. coli* productor de CTX-M, la hospitalización previa podría actuar como un marcador de la presencia de comorbilidades que sí predisponen a la infección de origen comunitario.

1.7.2 Corresistencia y manejo terapéutico.

Los mecanismos intrínsecos de desarrollo de resistencia a antimicrobianos (disminución de la permeabilidad o bombas de expulsión activas) causan normalmente una resistencia de bajo nivel. La adquisición de plásmidos es la principal causa de aparición de resistencia múltiple de alto grado. Los mismos plásmidos que codifican las BLEE suelen poseer también genes de resistencia a aminoglucósidos, quinolonas, cloranfenicol, tetraciclinas y otros, hecho que dificulta el tratamiento de las infecciones por los microorganismos que portan estos plásmidos (114). En un estudio que recogía datos de infección por *E. coli* de origen comunitario de 11 hospitales españoles entre 2002 y 2003, se hallaron tasas de resistencia a ciprofloxacino del 64% entre los aislados productores de BLEE. La tasa de resistencia

a trimetoprim-sulfametoxazol se situó en el 57% y la de amoxicilina-clavulánico en el 29% (100). En otro trabajo que incluía datos de estudios realizados en Europa, Asia y Norteamérica, se confirma la alta tasa de resistencia a ciprofloxacino entre los aislados productores de BLEE, alcanzando en la mayoría de los casos cifras superiores al 70% (94).

Como se ha comentado anteriormente, aproximadamente la mitad de los casos de infección por ECBLEE afectan a pacientes no hospitalizados siendo la ITU el tipo más frecuente de infección (5, 7, 98, 99). Otros estudios apuntan a que también está aumentando el número de casos de bacteriemias de origen comunitario causadas por enterobacterias productoras de BLEE (112, 115). Este hecho supone un problema considerable para los facultativos que tratan a estos pacientes, puesto que los antimicrobianos habitualmente recomendados como primera línea de terapia empírica para el tratamiento de la sepsis comunitaria y nosocomial originadas en el tracto urinario, así como para infecciones polimicrobianas de tejidos blandos e infecciones intraabdominales, incluyen las cefalosporinas y las quinolonas, fármacos que no son activos frente a la mayoría de estas cepas. Una demora en la aplicación de un tratamiento efectivo se relaciona con un aumento en la tasa de mortalidad (116). Además, el uso de antimicrobianos cuyos determinantes de resistencia son portados en los mismos plásmidos que las BLEE favorece la coselección de cepas de portadoras de BLEE.

En la situación descrita quedan pocas alternativas para el tratamiento de las infecciones provocadas por estos microorganismos multirresistentes. Las cefalosporinas y combinaciones de betalactámicos con inhibidor de betalactamasa (piperacilina-tazobactam) tienen efecto inóculo, es decir, aumenta la CMI en función del tamaño del inóculo (117). La endocarditis o los abscesos abdominales son algunos ejemplos de infecciones donde la carga bacteriana suele ser mayor que el inóculo estándar ensayado en el antibiograma. En el caso de que el microorganismo, además de producir BLEE, hiperproduzca betalactamasa cromosómica o penicilinasas, puede aparecer resistencia a estos antimicrobianos. A pesar de todo lo anteriormente expuesto, en infecciones no complicadas del tracto urinario puede utilizarse amoxicilina-clavulánico como tratamiento de segunda elección en cepas sensibles. Las cefamicinas son resistentes a la acción de las BLEE pero no suelen administrarse en estos casos por la facilidad con que puede desarrollarse resistencia durante el tratamiento por una disminución en la expresión de proteínas de membrana y por tanto de la permeabilidad de la misma.

Los carbapenémicos son de elección en el medio hospitalario para las infecciones por enterobacterias BLEE que revisten gravedad, aunque no han demostrado su superioridad a otros antimicrobianos que pueden usarse una vez que se dispone del antibiograma (118). Los inconvenientes de esta familia de antimicrobianos son su alto coste, la necesidad de administración por vía parenteral y la posibilidad de promover infecciones por microorganismos como levaduras o bacterias que tengan la capacidad de desarrollar resistencia a los mismos (119).

Las tasas de resistencia a los diferentes antimicrobianos varían entre países, entre ciudades e incluso entre hospitales, por lo que las guías de tratamiento empírico deben elaborarse adecuándose a esta información.

1.7.3 Problema de salud pública

El aumento de la prevalencia de infección por ECBLEE y su dispersión en la comunidad plantean un problema importante de salud pública a nivel mundial. Las infecciones causadas por ECBLEE, por las dificultades de detección precoz y tratamiento empírico comentadas anteriormente, se asocian con un incremento de la mortalidad, del tiempo de ingreso hospitalario y del coste económico. En los hospitales las medidas de control para evitar el aumento de infecciones van encaminadas a limitar la entrada y diseminación de microorganismos multirresistentes. Entre otras prácticas, es recomendable descontaminar las salas donde se hayan producido brotes de microorganismos con diseminación eminentemente clonal, extremar las medidas higiénicas adoptadas por el personal sanitario y limitar el uso de antimicrobianos, especialmente cefalosporinas de tercera generación y quinolonas.

Como se ha comentado, algunos trabajos de investigación apuntan a que quizás se está produciendo una entrada de microorganismos productores de BLEE desde la comunidad al medio hospitalario, donde se produciría un efecto selectivo por la mayor presión antibiótica (120). Si este hecho es cierto, las estrategias de control de infecciones que se elaboraron basadas en factores de riesgo habituales podrían no ser eficaces. En este sentido, se han iniciado diversos estudios a nivel mundial para evaluar el papel de diversos factores que podrían jugar en la dispersión de enterobacterias productoras de BLEE. Entre estos factores figura la entrada de microorganismos multirresistentes de origen animal en la cadena alimentaria humana.

1.8 Detección de enterobacterias BLEE en animales destinados al consumo humano y animales de compañía

En los últimos años se han publicado diversos estudios en Europa y otros países que han puesto de manifiesto la presencia de ECBLEE en animales destinados al consumo humano, animales de compañía e incluso animales salvajes. En ellos se describe mayoritariamente la prevalencia de BLEE en microorganismos aislados de muestras fecales de animales enfermos o sanos (fundamentalmente *E. coli* y en menor medida *Salmonella* spp.).

El primer aislamiento en España de una cepa productora de BLEE de origen animal se hizo en 1998. Se trataba de una cepa de *E. coli* productora de SHV-12 aislada de un perro enfermo (107). El número de publicaciones en este sentido ha ido en aumento desde entonces. Se ha aislado ECBLEE en muestras fecales y clínicas de animales destinados al consumo humano en distintos países como España (108, 121), Francia (122), Dinamarca (123, 124), Reino Unido (125-127), Japón (128, 129) y China (130, 131). También se ha detectado, aunque con menor frecuencia, ECBLEE en animales compañía (132, 133) e incluso animales salvajes (134). En España, en un estudio de muestras fecales de pollos realizado entre la Universidad de La Rioja y la Universidad Complutense de Madrid en 2001, se detectaron aislados de *E. coli* productores de SHV-12 o CTX-M-14 en el 1.6% de los aislados analizados (121). En 2003 los mismos autores repitieron el muestreo con la misma metodología, evidenciándose un incremento de este porcentaje (5%) y de la diversidad de enzimas (CTX-M-14, CTX-M-9 y SHV-12 (108). En Cataluña se llevó a cabo un estudio de cepas de ECBLEE obtenidas en granjas de pollos, cerdos y conejos en el que se detectó un mayor número y más variedad de BLEE entre los aislados de *E. coli* de pollos (CTX-M-1, CTX-M-14, CTX-M-9, CTX-M-32, SHV-12, SHV-2, SHV-5 y TEM-52) y un menor número y variedad entre los de cerdos (CTX-M-1, SHV-12 y SHV-5) y de conejos (CTX-M-14 y CTX-M-9) (135, 136).

En otros países como Japón se han realizado estudios de caracterización de BLEE en heces de animales sanos destinados al consumo humano, detectándose la presencia de CTX-M-2 y CTX-M-14 en pollos (128) y CTX-M-2 en ternera (129). En China se han detectado también distintos tipos de BLEE como CTX-M-3, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-24 y CTX-M-27 en aves, vacas y cerdos (130, 131).

1.9 Detección de enterobacterias BLEE en alimentos

La presencia de enterobacterias productoras de BLEE en animales destinados al consumo humano pone de manifiesto la posibilidad de que estos microorganismos puedan contaminar la carne de estos animales en algún momento durante el proceso de elaboración del producto final. En el momento en el que se inició este trabajo se habían publicado algunos estudios realizados sobre muestras de origen alimentario, fundamentalmente carne cruda de distinta procedencia animal, en los que se aislaron enterobacterias productoras de BLEE. En 2004, Jensen y cols. describieron el primer aislamiento en Dinamarca de una cepa de ECBLEE en una muestra de carne de ternera. El aislado, productor de TEM-52, fue recuperado de carne importada de Alemania (123). En Túnez, Jouini y cols. llevaron a cabo un estudio en 2006, en que analizaron no sólo muestras fecales de animales de granja sino también muestras de carne y pescado crudas destinada al consumo humano. En 11 (29%) de un total de 38 muestras de alimentos crudos se aisló ECBLEE. El 22% de muestras de carne de vaca y 80% de las muestras de carne de ave analizadas resultaron contaminadas con ECBLEE (137). En España, Mesa y cols. publicaron en 2006 los resultados de un trabajo que incluía, entre otras, muestras de ensalada y alimentos cocinados. En el 0.4% de estas muestras se recuperaron microorganismos productores de BLEE (2 de *E. coli* y 1 *K. pneumoniae*) (136).

Hipótesis y Objetivos

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La prevalencia de infecciones por ECBLEE ha ido en aumento en la última década, acompañada de un incremento significativo de los casos comunitarios, especialmente por *E. coli* productor de CTX-M. La epidemiología de estas infecciones es compleja y, aunque existen numerosos trabajos microbiológicos descriptivos y de estudio de los factores de riesgo asociados a estas infecciones, a día de hoy no se conocen con exactitud todos los factores que pueden estar contribuyendo a esta situación epidemiológica. En los últimos años algunos estudios han descrito la colonización intestinal por ECBLEE de una parte de los animales destinados al consumo humano. La contaminación con ECBLEE de productos alimenticios derivados de estos animales también había sido reportada en casos puntuales y a fecha de inicio de esta tesis doctoral eran escasos los análisis realizados sobre las características de estas bacterias y de sus determinantes de resistencia.

2.1 Hipótesis

Nuestra hipótesis general de trabajo ha sido que los productos cárnicos destinados al consumo humano constituyen un reservorio de ECBLEE desde el que los microorganismos o sus determinantes de resistencia pueden diseminarse a través de la cadena alimentaria en humanos:

- A) Los productos cárnicos crudos, así como otros productos cocinados, procesados o frescos, que se venden al por menor, pueden estar colonizados por ECBLEE.
- B) Los aislados ECBLEE que colonizan estos productos alimenticios pueden estar relacionados con los que producen infección en humanos.
- C) Los plásmidos que portan las BLEE de los aislados que colonizan los productos alimenticios pueden estar relacionados con los plásmidos de los aislados que producen infección en humanos.

2.2 Objetivos

El objetivo de este trabajo ha sido determinar la posible relación entre aislados ECBLEE de origen alimentario y origen clínico en un área sanitaria

caracterizada por tener una moderada prevalencia de infecciones comunitarias por ECBLEE. Para ello se llevaron a cabo las siguientes líneas de trabajo:

1. Determinar la prevalencia de colonización por ECBLEE y caracterizar los tipos de BLEE en dos grupos de alimentos:
 - Productos cárnicos crudos.
 - Otros productos cocinados o frescos (verduras frescas, alimentos cárnicos cocinados, alimentos para mascotas de origen animal y cáscara de huevo).
2. Determinar la prevalencia de ECBLEE de origen clínico, nosocomial, comunitario y relacionado con la asistencia sanitaria, en el área sanitaria Virgen Macarena y caracterizar los tipos de BLEE.
3. Comparar los tipos de BLEE expresados por los aislados de origen clínico y alimentario.
4. Estudiar la posible relación clonal de los aislados de origen clínico y alimentario.
5. Determinar si existen similitudes en los elementos genéticos que portan los determinantes de resistencia, caracterizando los plásmidos de interés.

Material y métodos

3. MATERIAL

3.1 Cepas bacterianas

3.1.1 Aislados clínicos

El área hospitalaria Virgen Macarena de Sevilla comprende un hospital de agudos de 950 camas (Hospital Virgen Macarena) y un hospital de media y larga estancia con 150 camas (Hospital de San Lázaro) atendiendo a una población de 550.000 habitantes. Se seleccionaron todos los aislados consecutivos procedentes de muestras clínicas remitidas al Servicio de Microbiología del Hospital Virgen Macarena en un período de siete meses comprendido entre el 1 de septiembre de 2006 y el 31 de marzo de 2007, que cumplían los criterios descritos a continuación:

- Identificación correspondiente a *Escherichia coli* obtenida mediante panel de identificación de gram negativos Wider (Francisco Soria Melguizo).
- CMI de al menos uno de los betalactámicos cefotaxima, ceftazidima y cefepime igual o superior a 2 mg/l.
- Técnica de doble disco positiva en alguno de los antibióticos cefotaxima o ceftazidima.

Se excluyeron los aislados procedentes de muestras del mismo paciente y la misma muestra cuyo antibiograma no evidenciara diferencias de más de dos diluciones en las CMIs de los distintos grupos de antimicrobianos. En un caso se seleccionaron dos aislamientos de la misma paciente obtenidos con una diferencia de tiempo mayor de 3 meses al considerarse episodios distintos. Todos los aislamientos fueron conservados en caldo tripticosa soja (TSB; Disco, Detroit. EEUU) con un 10% de glicerol (Difco) a -80 °C hasta su utilización.

3.1.2 Aislados de origen alimentario

Se estudiaron un total de 249 muestras de origen alimentario, entre los que se encontraban productos adquiridos en establecimientos comerciales (muestras cárnicas crudas, huevos y alimento para mascotas) y productos de elaboración casera (carne de pollo cocinada y vegetales crudos dispuestos para el consumo). Se seleccionaron 3 tipos de establecimientos comerciales para adquirir los productos

cárnicos: grandes superficies, supermercados y mercados tradicionales. Entre septiembre de 2006 y marzo de 2007 se realizaron 2 compras mensuales de los productos cárnicos listados a continuación, incluyendo 2 muestras de cada tipo de alimento de lotes diferentes cuando era posible. Los huevos se adquirieron en supermercados (empaquetados) y en mercado tradicional (no empaquetados) y el alimento para animales de compañía en supermercados.

- De establecimientos comerciales:
 - 109 productos cárnicos:

Producto cárnico	Nº de muestras
Pollo	18
Pavo	15
Cerdo	16
Cerdo picado	15
Ternera picada	15
Jamón serrano	15
Salchichón	15

Tabla 5. Número de muestras incluidas en el estudio

- 72 huevos (22 empaquetados y 50 sin empaquetar).
 - 6 paquetes de comida para animales de compañía.
- De preparación casera:
 - 32 muestras de ensalada.
 - 30 muestras de pollo cocinado.

Los alimentos de preparación casera fueron aportados por parte del personal trabajador del hospital, así como familiares y conocidos de los mismos. Se indicó a los mismos que depositaran en un contenedor estéril proporcionado previamente una muestra del alimento en cuestión tal y como lo cocinan habitualmente. Además se recomendó mantenerlo refrigerado desde su preparación hasta la entrega en el laboratorio. La hoja de datos de recogida de muestra se encuentra en el anexo 1.

3.1.3 Cepas control

- *Escherichia coli* ATCC 25922.
- *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 (138).

- *Salmonella braenderup* H9812, cedida por el Dr. Jorge Blanco del LREC, Lugo.
- Cepas control de filogrupo: Se utilizaron 5 cepas de la colección ECOR cedidas por la doctora Eva Moreno Pujol, del Hospital Universitario Vall d'Hebron:

ECOR	Cepa	Grupo Filogenético	Perfil
ECOR 16		A (subgrupo A ₀)	chuA-, yjA-, TspE-
ECOR 1		A (subgrupo A ₁)	chuA-, yjA+, TspE-
ECOR 69		B1	chuA-, yjA-, TspE+
ECOR 52		B2 (subgrupo B2 ₃)	chuA+, yjA+, TspE+
ECOR 39		D (subgrupo D1)	chuA+, yjA-, TspE-

Tabla 6. Cepas de la colección ECOR utilizadas en el estudio

- Cepas control de la producción de BLEE: se utilizaron como control de la producción de BLEE, las siguientes cepas cedidas por el grupo del Dr. Rafael Cantón:
 - *E. coli* productor de SHV.
 - *E. coli* productor de CTX-M-1 grupo.
 - *E. coli* productor de CTX-M-9 grupo.

3.1.4 Cepas para experimentos de conjugación y transformación

- *Escherichia coli* J53 resistente a azida sódica (*F*-, *met*-, *pro*-) (139).
- *Escherichia coli* DH10B (*F*⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *endA1* *ara* Δ 139(*ara*, *leu*)7697 *galU* *galK* λ -*rpsL* (Str^R) *nupG*) (140).

3.2 Medios de cultivo

- Agar sangre (AS, BioMerièux, Marcy-I'Étoile, Francia).
- Agar triptona y soja (TSA, Scharlau, Barcelona, España).
- Agar y caldo Mueller Hinton (MHA, MHB, Difco, St. Louis, EEUU).
- Caldo tripticasa-soja con un 10% de glicerol (TSB, Difco, Sparks, MD, EEUU).
- Agar Mueller Hinton con ampicilina (100 mg/l).
- Agar MacConkey (Oxoid, Reino Unido).

- Agar MacConkey suplementado con cefotaxima (1 mg/l) (Sigma, St. Louis, EEUU).
- Agar MacConkey suplementado con ceftazidima (1 mg/l) (Sigma, St. Louis, EEUU).
- Agua de Peptona (peptona 10g/l, cloruro sódico (10g/l) y agua destilada.)
- Medio LB (CINa 10g/l, Bacto Triptasa 10 g/l, extracto de levadura 5g/l).
- Medio deficiente en prolina y metionina: compuesto por caldo A, sulfato magnésico y glucosa al 20%. Preparado según el protocolo siguiente:

Preparar 1l de Caldo A, a concentración 5x, autoclavar y guardar a 4 °C.

- Sulfato amónico 30mM.
- Fosfato monopotásico 165 mM.
- Fosfato dipotásico 301 mM.
- Citrato sódico 8 mM.

- Preparar 100 ml de solución de MgSO₄.7H₂O 1M y esterilizar por filtración.
- Preparar 100 ml de glucosa al 20% y esterilizar por filtración.
- Diluir el caldo A en agua destilada estéril a 1x y añadir agar al 1,5% antes de autoclavar.
- Enfriar el medio A a 50 °C y añadir:
 - 1 ml de MgSO₄.7H₂O
 - 10 ml de glucosa al 20%

Con lo que nos queda una concentración final:

- Sulfato amónico 6mM.
- Fosfato monopotásico 33 mM.
- Fosfato dipotásico 60 mM.
- Citrato sódico 1,6 mM.
- Sulfato magnésico mM.
- Glucosa al 0,2%.

- Dispensar en placas.
- Agar Mueller Hinton (MH) selectivo.
 1. Agar Mueller Hinton con Azida 200 mg/l y cefotaxima 2 mg/l.
 2. Agar MH con Azida [200µg/ml] y CAZ [2µg/ml]
- Agar triple azúcar y hierro (TSI, OXOID).
- Urea Broth Base (Oxoid, Reino Unido).

- Caldo nutritivo (Difco, Sparks, MD, EEUU).

3.3 Productos químicos y microbiológicos

- Agarosa Grade Molecular Biology (Promega, España).
- Agarose D-1 baja EEG (Pronadisa, Madrid, España).
- Agarosa para PFGE (Bio-Rad, Hercules, Canadá).
- Agua destilada (Braun Medical, España).
- Agua miliQ.
- Azida sódica (Sigma, St. Louis, EEUU).
- Azul de bromofenol (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, EEUU).
- Bacto-peptona (Difco, Sparks, MD, EEUU).
- Bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, EEUU).
- Citrato sódico (Sigma, St. Louis, EEUU).
- Cloruro magnésico ($MgCl_2$; GibcoBRL, EEUU).
- Cloruro sódico (NaCl, Panreac, Barcelona, España).
- Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs; Pharmacia Biotech, España).
- EDTA, Ácido etilendiamino tetraacético (Merck, Madrid, España).
- Enzima Xba I (10U/ μ l) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania).
- Etanol absoluto 98% (Scharlau, Barcelona, España).
- Extracto de levadura (Scharlau, Barcelona, España).
- Fosfato dipotásico (Sigma, St. Louis, EEUU).
- Fosfato potásico dihidratado (Sigma, St. Louis, EEUU).
- Geles de poliacrilamida al 5% PhastGel IEF 3-9 (Pharmacia Biosciencias, Suecia).
- Glicerol 87% (Panreac, Barcelona, España).
- Kado Buffer: 50 mM Tris / 1mM EDTA pH 8.
- Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, Canadá).
- Nitrocefina (Oxoid, Reino Unido).
- Proteinasa K (Fermentas Life Science).
- Rifampicina (Sigma, St. Louis, EEUU).
- Sarkosyl (N-lauril sarcosina, Sigma, St. Louis, EEUU).
- SDS (lauril sulfato sódico. Sigma, St. Louis, EEUU).
- SuRE/Cut Buffer H (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania).

- Tampón de electroforesis Tris-acético-EDTA (TAE; Sigma, St. Louis, EEUU).
- Tampón de electroforesis Tris-borato-EDTA (TBE; Sigma, St. Louis, EEUU).
- Tampón de electroforesis Tris-EDTA (TE).
- Tampón de lisis (50mM EDTA + 1% Sarkosil, pH 8.0).
- Taq DNA polimerasa (New England Biolabs, Reino Unido).
- Tris: Trizma Base (Sigma, St. Louis, EEUU).
- Solución de lisis para extracción de plásmidos por el método Kado:
 - 5.75 ml de agua MiliQ.
 - 2 ml de SDS al 15%.
 - 2 ml 250 mM de Tris pH 8.
 - 150 µl 5N NaOH.

Esta solución se prepara en el momento que se va a utilizar.

- Solución de Kieser para extracción de plásmidos:
 - Sacarosa (0.3M) 10.2 g.
 - Tris-HCL (25Mm, pH 8) 2.5 ml Tris-HCL 1M.
 - EDTA-Na2 (25 mM, pH 8) 10 ml EDTA-Na2 250 Mm.
 - Verde de bromocresol (0.02%) 20 mg.
 - Agua destilada estéril Hasta 100 ml.

Conservar a temperatura ambiente.

- Solución de lisis para extracción de plásmidos por el método Kieser:
 - NaOH (0.3N) 600 µl de NaOH 5N.
 - 8.4 ml de agua destilada estéril.
 - SDS (2%) 1 ml de SDS al 20%.

Esta solución se prepara en el momento que se va a utilizar.

- Solución fenol-cloroformo ácido para método Kieser:
 - 50 g de fenol
 - 50 ml de cloroformo
 - 10 ml de agua destilada estéril
 - 50 mg de 8-Hidroxiquinoleína

Conservar a temperatura ambiente protegida de la luz.

- Medio SOC para electroporación. Condiciones para 1 litro:
 - Triptona 20 g/L, extracto de levadura 5g/L

- Cloruro sódico 0.5 g/L
- 10 ml de cloruro potásico 250 mM.
- Reactivos para hibridación de ácidos nucleicos:
 - Se utilizó el sistema de la casa comercial Roche (Mannheim, Alemania), "*DIG High Primer DNA Labeling and Detection Starter Kit*" para el marcaje y detección de ácidos nucleicos.
 - Como soporte del material genético se utilizaron las membranas de nylon Hybond-N+ (Amersham Pharmacia, Piscataway, EEUU).
 - El revelado se realizó sobre las películas fotográficas de la casa comercial Roche "*Lumi-Film Chemiluminiscent Detection*". Alternativamente, para obtener una mayor cantidad de sonda marcada, se utilizó el sistema de sonda de Roche "*PCR DIG Labeling Mix*".
 - Las soluciones no proporcionadas por los sistemas comerciales usados se detallan a continuación:

1. Soluciones de transferencia:

- Solución de depuración (HCl 0.12 N). Diluir 11 ml de HCl 37% en 1L de agua destilada.
- Solución de desnaturalización (NaOH 0.5N + NaCl 1.5 M). Disolver 87.6 g de NaCl y 20 g de NaOH en 1L de agua destilada.
- Solución de neutralización (Tris 0.5M + NaCl 1.5M). Disolver 87.6 g de Tris-base y 60.5 g de NaCl en 1L de agua destilada. Ajustar a pH 7.5.
- Solución de transferencia (SSC 20x). Disolver 175 g de NaCl y 88.2 g de Citrato sódico hidratado en un 1L de agua destilada. Ajustar a pH 7.0.
- Soluciones para la detección inmunológica:
 - Tampón de ácido maleico (0.1M Ácido maleico + NaCl 0.15M). Disolver 11.6 g de ácido maleico, 8.75 g de NaCl y 7 g de NaOH en 1 L de agua destilada. Ajustar a pH 7.5.
 - Tampón de lavado (0.1M Ácido maleico + NaCl 0.15M + .3% (v/v) Tween 20). Añadir 0.6 ml de Tween 20 a 200 ml de tampón de ácido maleico.
 - Tampón de detección (0.1M Tris-HCl, 0.01M NaCl). Disolver 3.16 g de Tris-HCl y 1.16 g de NaCl en 200 ml de agua destilada. Ajustar a pH 9.5.

2. Solución de bloqueo: Es comercial, se prepara a 10 X, se alícuota en 20 ml y se congela, añadir 180 ml de buffer maleico en el momento de su utilización para obtener una concentración 1x.
3. DIG EASY: Comercial.

3.4 Antimicrobianos

- Azida sódica (AZ, Sigma-Aldrich).
- Cefotaxima (CTX, Sigma-Aldrich).
- Ceftazidima (CAZ, Sigma-Aldrich).
- Ampicilina (AMP, Sigma-Aldrich).
- Discos de papel de antibióticos a concentraciones estandarizadas (Oxoid, Reino Unido).

La preparación de los antimicrobianos se realizó siguiendo la normativa del CLSI. Las soluciones concentradas se prepararon a una concentración de 4096 µg/ml y se almacenaron a -70 °C hasta su utilización. En la Tabla 7 se muestran los solventes y diluyentes usados para la preparación los antimicrobianos.

Antimicrobiano	Solvente	Diluyente
Ampicilina	Tampón fosfato, pH8, 0.1M.	Tampón fosfato, pH6, 0.1M
Cefotaxima	Agua	Agua
Ceftazidima	Carbonato sódico	Agua

Tabla 7. Solventes y diluyentes usados para la preparación de los antimicrobianos

Antimicrobianos	Carga (μg)
Betalactámicos	
Amoxicilina-ácido clavulánico (AMC).	20:10
Cefepime (FEP)	30
Cefotaxima (CTX).	30
Cefotaxima/ácido clavulánico (CTX/CLA).	30/10
Cefoxitina (FOX).	30
Ceftazidima (CAZ).	30
Ceftazidima/ácido clavulánico (CAZ/CLA).	30/10
Cefuroxima (CXM).	30
Piperacilina-Tazobactam (PTZ).	100/10
Aminoglucósidos	
Amikacina (AK).	30
Gentamicina (CN).	10
Tobramicina (TOB).	10
Quinolonas	
Ácido nalidíxico (NA).	30
Ciprofloxacino (CIP).	5
Carbapenémicos	
Ertapenem (ETP).	10
Otros	
Fosfomicina (FOT).	50

Tabla 8. Discos de antibióticos utilizados para la determinación de sensibilidad y carga de los mismos. (Oxoid, Reino Unido)

3.5 Equipos

- Cabina deseguridad BIO-II-A (Telstar, España).
- Cámara de fotos digital Kodak DC290 (Eastman Kodak, EEUU).
- Cubetas de electroforesis Sub-Cell GT (Bio-Rad, Hercules, Canadá).
- Eddy Jet-Spiral Platter (IUL, Barcelona, España).
- Equipo de electroforesis en campo pulsante CHEF- Mapper (Contour-clamped Homogeneous Electric Field) (Bio-Rad, Hercules, Canadá).
- Equipo de documentación de imágenes Gel Doc XR (Bio-Rad, Hercules, Canadá).
- Fuente de alimentación modelo 1000-500 (Bio-Rad, Hercules, Canadá).
- Kit de purificación de ADN Sephaglas Band prep. (Farmacia).
- Microcentrífuga Biofuge Fresco (Heraeus).
- Secuenciador ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, Perkin Elmer, EEUU).
- Stomacher® 80 MicroBiomaster Lab Blender (Seward, UK).
- Termociclador Gene Cyclor (Bio-Rad, Hercules, Canadá, España).
- Sistema semiautomatizado de identificación y antibiograma Wider® (Francisco Soria Melguizo, Madrid, España).
- Hybrigene (Techne, UK).
- UVC500 Crosslinker (Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA).
- MicroPulser™ electroporator (Bio-Rad, Hercules, Canadá).

3.6 Software

- Bio-Rad Canada Quantity One® Software.
- Fingerprinting II SW software (Biorad, , Hercules, CA, USA).
- Sistema de análisis digitales Kodak 1D EDAS290 (Eastman Kodak).
- Software de análisis de secuencias:
 - Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).
 - BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
 - Transeq (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/index.html>).
 - ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

- MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software. Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007). Version 4.0
- SPSS software (version 17.0; SPSS, Chicago, Illinois, United States).

3.7 Cebadores

Cebador	Secuencia (5' - 3')	Tamaño esperado (pb)	T ^a de anillamiento (°C)
CTX-M-1-F	ATG GCG ACG GCA ACC GTCA	875	64
CTX-M-1-R	CAA ACC GTT GGT GAC GAT TTTA		
CTX-M-9-F	GTG ACA AAG AGA GTG CAA CGG	856	62
CTX-M-9-R	ATG ATT CTC GCC GCT GAA GCC		
SHV-1-F	GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC	930	55
SHV-2-R	TTA GCG TTG CCA GTG CTC		

Tabla 9. Cebadores específicos del tipo de BLEE (TIB Molbiol, Alemania)

Cebador	Secuencia (5' - 3')	Tamaño esperado (pb)	T ^a de anillamiento (°C)
REP-1	IIIGCGCCGICATCAGGC	100-5000	40
REP-2	ACGTCTTATCAGGCCTAC		

Tabla 10. Cebadores utilizados para llevar a cabo la REP-PCR (Amersham Pharmacia Biotech, España)

Cebador	Secuencia (5' - 3')	Tamaño esperado (pb)	T ^a de anillamiento (°C)
chuA-1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	59
chuA-2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
yja-1	TGAAGTGTGACAGGAGACGCTG	211	59
yja-2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		
tspE4C2-1	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152	59
tspE4C2-2	CGCGCCAACAAAGTATTACG		

Tabla 11. Cebadores utilizados en el estudio de filogrupos (Invitrogen, Carlsbad, Canadá)

Cebador	Secuencia (5' - 3')	Tamaño (pb)	Tª de anillamiento (°C)
O25AB-F	ATACCGACGACGCCGATCTG	300	60
O25B-R	TGCTATTCATTATGCGCAGC		
O25A-R	GAGATCCAAAAACAGTTTGTG		

Tabla 12. Cebadores utilizados para el serotipado de cepas (Invitrogen, Carlsbad, Canadá)

Cebador	Secuencia (5' - 3')	Tamaño esperado (pb)	Tª de anillamiento (°C)
AFAC-F	TTTCTGCTGAACTGGCAGGC	665	64
AFAC-R	GTCAGCCCCAGGGCAGAC		
AER-1	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	602	60
AER-2	AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG		
CDT-S1	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG	467	58
CDT-AS1	AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA		
CDT-S2	GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG	430	50
CDT-AS2	AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTA		
CNF1-F	GAAGTTATTAAGGATAGT	544	50
CNF1-R	CATTATTTATAACGCTG		
CNF2-F	AATCTAATTAAGAGAAC	544	50
CNF2-R	CATGCTTTGTATATCTA		
CNF3-F	ACTTTACAATAAAGCATTAA	405	50
CNF3-R	ACACCATAAAAAGTAGAACCAT		
FIMH-F	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	508	66
FIMH-R	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA		
FIMAVMT78-F	TCTGGCTGATACTACACC	266	52
FIMAVMT78-R	ACTTTAGGATGAGTACTG		
HLY1 (13A)	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1177	58
HLY2 (13B)	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA		
IBEA10F	AGGCAGGTGTGCGCCCGTAC	170	52
IBEA10R	TGGTGCTCCGGCAAACCATGC		
K1-F	AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	676	52
K1-R	GGTGGTACATTCCGGGATGTC		
PAP-3 (12A)	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	336	64
PAP-4 (12B)	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA		
SFA-1	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410	64
SFA-2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA		
TSH03	GGTGGTGCCTGGAGTGG	640	64
TSH15	AGTCCAGCGTGATAGTGG		
CVAC-F	CACACACAAACGGGAGCTGTT	680	58
CVAC-R	CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT		

Tabla 13. Cebadores utilizados para la amplificación de genes de virulencia. Invitrogen, Carlsbad, Canadá

Fragmento	Cebadores	Secuencia (5´-3´)	Tamaño esperado (pb)	Tª de anillamiento (°C)
Junction 1	PemK up	CACGGGGCGGAAAACGACT	432	58
	TnpATn5403 low	ACAGAGGGGCAGCACTACC		
Junction 2	TnpR Tn 5403 up	GACCAAATCAGACCGACTT	355	55
	TnpA Tn 1721 low	AGCCGCCACTTCACCCACTT		
Junction 3	Cat B3 up	CATCATCTTCCCGTTCTTTT	1177	30
	AAC 3-II low	ACCGTCTCCGCTCCTCCTTC		
Junction 4	AAC 3-II up	CGTGGGCTTTGCTCAGTGCT	1368	58
	ORF B´low	GTGTTCCGGCGCGGTAGAT		
Junction 5	ORF B´Up	GGGTGCGTGGCGAGACAATG	1482	55
	Tnp A Tn 3 low	ACTGGACAAAAGCGAACTAT		
Junction 6	PCR inv <i>ISEcp1</i> 272	TTCAATAAAATCAAAAATCCCA	2268	55
	Tem 1 low	ATACCGCACCATAGCAGA		
<i>tet A</i>	<i>tetA</i> up	GTTTCGGGTTCCGGATGGTC	732	58
	<i>tetA</i> low	GCAGGCAGAGCAAGTAGAGG		
<i>aac(3)-II</i>	<i>aac3IIF</i>	TGCCTCACTTAAAGCGATTG	500	58
	<i>aac3IIR</i>	CAAGCATCGGCATCTCATA		
IS26	<i>tnpA</i> IS26	AGCGGTAAATCGTGGAGTGA	2805	50
	IS26 5´	CAAAGTTAGCGATGAGGCAG		
<i>ISEcp1</i>	<i>ISEcp1</i> debut	TTCAAAAAGCATAATCAAAGCC	271	55
	PCR inv <i>ISEcp1</i> 272	TTCAATAAAATCAAAAATCCCA		
<i>blaOXA-1</i>	OXA-1 up	CAGCAGCGCCAGTGCATC	658	55
	OXA-1 low	TCCTGTAAGTGGGACAC		
<i>aac(6´)-Ib</i>	AAC6´-Ib up	ATGACTGAGCATGACCTT	489	55
	AAC6´-Ib low	GAAGGGTTAGGCATCACT		
<i>blaTEM</i>	tem1	ATGAGTATTCAACATTTCCG	867	55
	tem2	CTGACAGTTACCAATGCTTA		
<i>catB-3´</i>	catb3F	ATCTGTTTCCGGACCGTG	500	58
	catb3R	CTTTTGTACCAACGAGCG		
Putative promotor region (W)	<i>bla</i> /PF PR	GCCAGTGACATCGTCCATTGACG TGCTCTGTGGATAACTTGCAAGAG	595	58

Tabla 14. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes asociados al gen *bla*_{CTX-M-15} y del entorno genético del mismo

Cebadores	Secuencia	Locus	Tamaño (pb)
HI1 FW	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	parA-parB	471
HI1 RV	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA		
HI2 FW	TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC	iterones	644
HI2 RV	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT		
I1 FW	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	RNAI	139
I1 RV	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT		
X FW	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	ori g	376
X RV	TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC		
L/M FW	GGATGAAAATATCAGCATCTGAAG	repA,B,C	785
L/M RV	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG		
N FW	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	repA	559
N RV	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC		
FIA FW	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	iterones	462
FIA RV	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG		
FIB FW	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	repA	702
FIB RV	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT		
W FW	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG	repA	242
W RV	GGTGCGCGGCATAGAACCGT		
Y FW	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	repA	765
Y RV	GCGAGAATGGACGATTACAAAATTT		
P FW	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	iterones	534
P RV	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC		
FIC FW	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	repA2	262
FIC RV	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT		
A/C FW	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	repA	465
A/C RV	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT		
T FW	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	repA	750
T RV	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC		
FIIS FW	CTGTCGTAAGCTGATGGC	repA	270
FIIS RV	CTCTGCCACAAACTTCAGC		
FrepB FW	GATCGTTTAAGGAATTTTG	RNAI/repA	270
FrepB RV	GAAGATCAGTCACACCATCC		
K/B FW	GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC	RNAI	160
K RV	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA		
B/O RV	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	RNAI	159

Tabla 15. Cebadores utilizados para el tipado de plásmidos (caracterización del grupo de incompatibilidad) por PCR-Based Replicon Typing (PBRT)

Locus	Cebadores	Secuencia (5´-3´)	Tamaño esperado (pb)	T^a de anillamiento (°C)
<i>rep1</i>	repI1 FW	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	142	60
	repI1 RV	TCGTTCGTTCCGCCAAGTTCGT		
<i>ardA</i>	ardA FW	ATGTCTGTTGTTGCACCTGC	501	60
	ardA RV	TCACCGACGGAACACATGACC		
<i>trbA</i>	trbA FW	CGACAAATGCTTCCGGGGT	507	60
	trbA RW	TCTTACAATCGACAGCCTGT		
<i>SogS</i>	sogS FW	TTCCGGGGCGTAGACAATACT	291	60
	sogS RV	AACAGTGATATGCCGTCGC		
<i>piL</i>	piL FW	CCATATGACCATCCAGTGCG	316	60
	piL RV	AACCACTATCTCGCCAGCAG		

Tabla 16. Cebadores utilizados para el subtipado de plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad I1

4. MÉTODOS

4.1 Aislamiento e identificación de aislados de origen alimentario

Los aislados se obtuvieron tras el procesamiento de las muestras de alimentos descritas anteriormente.

4.1.1 Procesamiento de las muestras cárnicas

Se anotó la procedencia de todas las muestras y se procesaron siguiendo el protocolo descrito a continuación:

- Abrir de manera aséptica los envoltorios de las muestras y registrar todos los datos del producto:
 - Código de barras de elaboración/procedencia.
 - Fecha de la compra y fecha de elaboración.
 - Tipo de alimento cárnico.
 - Peso neto.
- Con bisturí estéril cortar una pieza de carne de 5 cm² aproximadamente y pesarla sobre una placa de Petri estéril anotando el peso.
- Trocear la carne sobre la placa de Petri e introducir en una bolsa de Stomacher[®] estéril, añadiendo parte del volumen de dilución.
- Colocar la bolsa en el Stomacher[®] y proceder a su homogeneización durante 15 minutos.
- Transferir el homogeneizado a la botella con el resto del volumen de dilución (dilución 1:10) agitando manualmente durante 5 minutos.
- Sembrar 50 µL del homogeneizado en agar MacConkey mediante Spiral Platter[®] para recuento de coliformes utilizando el programa L50.
- Incubar el resto durante 24 horas en estufa a 37 °C.
- Sembrar 50 µL del homogeneizado reincubado mediante Spiral Platter[®] en agar MacConkey con 2 mg/L de cefotaxima y MacConkey con 2 mg/L de ceftazidima.
- Incubar las placas durante 24 horas a 37 °C.

4.1.1.1 Siembra para recuento de coliformes totales

Con el sistema de inoculación en espiral, se deposita un volumen conocido de muestra, desde el centro hasta el extremo exterior de la placa. El patrón de distribución implica una disminución en la concentración de la muestra a medida que avanza el proceso. Este efecto se consigue en dos pasos:

1. El incremento de ángulo y radio.
2. La reducción del flujo de salida de la muestra, desde el centro a la periferia de la placa.

De esta forma, el volumen de muestra depositado por unidad de área disminuye a lo largo de la espiral con el resultado de un efecto de dilución de hasta 3 órdenes de magnitud. Después de incubar las placas, las colonias aparecen distribuidas a lo largo de la trayectoria de la espiral, mostrando como disminuye su concentración a medida que aumenta el radio de la placa. El recuento de colonias se hace manualmente, con una plantilla basada en esta distribución. El recuento de colonias y el cálculo de UFC/ml (unidades formadoras de colonias) se realizaron según las indicaciones del fabricante.

4.1.1.2 Screening de *E. coli* en muestras cárnicas

Se seleccionaron las colonias fermentadoras de lactosa que crecieron en las placas selectivas para su posterior análisis. A cada morfotipo se le realizaron pruebas de identificación bioquímica:

- TSI (Triple Sugar Iron).
- Producción de ureasa en el medio de Cristensen.
- Producción de indol a partir de caldo peptonado.

4.1.2 Procesamiento de la superficie de los huevos

Se adquirieron un total de 72 huevos (22 empaquetados y 50 no empaquetados) en distintos establecimientos de Sevilla, enumerándolos y registrando datos de datos del lote, origen y día de puesta. Se siguió el protocolo detallado a continuación:

- Introducir los huevos en contenedores estériles y completar con agua de peptona hasta 50 ml.

- Mantener en un baño-agitador a 37 °C con agitación suave toda la noche y plaquear 50 µl con Spiral platter en:
 - Agar Mac Conkey con 2 mg/l de cefotaxima.
 - Agar Mac Conkey con 2 mg/l de ceftazidima.
- De las placas con medio selectivo aislar todos los morfotipos de colonias lactosa positiva y analizar por métodos bioquímicos, sembrando en tubos de TSI, urea e indol.
- Determinar la producción de BLEE mediante la prueba de doble difusión con discos.

4.1.3 Procesamiento de otros alimentos

Ensalada: Se procesaron 32 muestras de ensalada recogidas en contenedor estéril. El protocolo de procesamiento empleado fue el mismo que para los alimentos crudos. De igual manera, se realizó recuento de coliformes según el protocolo descrito anteriormente para alimentos crudos.

Alimentos cocinados: Se procesaron 30 muestras de pollo cocinado recogidas en contenedor estéril. El protocolo de procesamiento y recuento de coliformes empleado fue el mismo que para los alimentos crudos.

Alimentos para animales de compañía: Se procesaron 6 muestras de alimento para mascotas mediante el protocolo utilizado para los alimentos crudos.

4.2 Aislamiento e identificación de aislados clínicos

La identificación y antibiograma de los aislamientos se realizó mediante la técnica de microdilución en caldo semiautomatizada con el sistema Wider® siguiendo las recomendaciones del fabricante.

4.3 Estudio de sensibilidad a antimicrobianos

En las cepas de origen alimentario se determinó la sensibilidad a los distintos antimicrobianos descritos en la Tabla 8 mediante el método de Kirby-Bauer. Las cepas de origen clínico se estudiaron mediante el sistema de microdilución en caldo semiautomatizado Wider®.

Se consideraron multirresistentes aquellos aislados que mostraron resistencia in vitro a algún representante de 2 o más grupos de antimicrobianos habitualmente

empleados para tratar las infecciones que con más frecuencia produce el microorganismo.

4.3.1 Kirby-Bauer

En el método de difusión en agar o método de Kirby Bauer (141) se inocula una cantidad estandarizada del microorganismo, de manera uniforme en la superficie de una placa de agar. Se colocan discos de papel de filtro impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban 18-24 horas a 35-37°C. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al microorganismo en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a puntos de corte establecidos anualmente para cada combinación de microorganismo y antibiótico por los organismos encargados del control de tales métodos, en nuestro caso, el CLSI. Los resultados se expresan como: Sensible (S), Intermedio (I) y Resistente (R).

4.3.2 Microdilución. Sistema WIDER

WIDER I (Francisco Soria Melguizo, S.A., Madrid) es un sistema semiautomatizado de microdilución. El sistema está adaptado para utilizar paneles de MicroScan de 96 pocillos que incluyen pruebas bioquímicas de identificación bacteriana y determinación de sensibilidad antibiótica (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc., Deerfield, IL) (Cantón y cols. 2000). Incorpora un módulo de lectura equipado con una cámara digital de vídeo (Hitachi KP-D50 color, Crofton, MD, USA) y un software que interpreta las imágenes y ofrece los resultados de identificación y antibiograma. Puede realizarse también una lectura visual tanto del crecimiento como de las reacciones.

Los criterios de interpretación de sensibilidad son modificables por el usuario para adaptarse a las guías de distintos comités (CLSI, MENSURA, EUCAST, etc.). En este caso los puntos de corte que se emplearon para determinar un aislado como sensible o resistente se basaron en las recomendaciones del CLSI.

4.3.3 Métodos fenotípicos para la detección de la producción de BLEE

Los métodos fenotípicos emplean discos con un inhibidor de betalactamasas, usualmente ácido clavulánico, en combinación con varias oximiino cefalosporinas, como ceftazidima y cefotaxima. En la actualidad, el método recomendado por el CLSI (55) es la técnica del doble disco, que consiste en colocar en la placa de MH, inoculada con una suspensión del microorganismo de turbidez equivalente al 0.5 de McFarland, discos de cefotaxima y ceftazidima con y sin ácido clavulánico a concentraciones estándar (30 µg y 30/10 µg). Se confirmará la producción de BLEE si se observa un aumento del halo de inhibición de la cefalosporina con el inhibidor mayor de 5 mm respecto al halo de la cefalosporina sola.

En el caso de los aislamientos de origen alimentario, cuando su identificación bioquímica fué compatible con *E. coli*, se seleccionaron aquellos morfotipos crecidos en medios selectivos con cefotaxima y ceftazidima. Para los aislamientos clínicos se aplicó el criterio de seleccionar todos los aislamientos cuya CMI a cefotaxima o ceftazidima fuera mayor o igual a 2µg/ml. A todos se les realizó el despistaje producción de BLEE mediante la técnica de doble disco.

4.4 Caracterización de las enzimas BLEE

4.4.1 Isoelectroenfoque

Las betalactamasas de las cepas estudiadas y sus transconjugantes se caracterizaron mediante isoelectroenfoque (IEF) utilizando el sistema PhastSystem con geles de acrilamida al 5% PhastGel IEF 3-9.

1) Crecimiento de las bacterias.

- (a) Inocular la cepa en 15 ml de MHB a partir del crecimiento en medio sólido. Incubar 18-20 h a 37 °C en agitación.
- (b) Una vez incubado, poner en hielo.
- (c) Centrifugar 15 minutos a 4000 rpm a 4 °C.
- (d) Decantar el sobrenadante y lavar con 15 ml de 10mM NaPO₄ (pH 7.2). Centrifugar durante 10 minutos.
- (e) Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 5 ml de 10 mM NaPO₄ (pH 7.2).
- (f) Congelar y descongelar 5 o6 veces a -30 °C.

2) Sonicación de las bacterias.

- (a) Sonicar la suspensión bacteriana 5-7 pulsos de 30 segundos con intervalos de un minutos aproximadamente, manteniendo el tubo en hielo mientras se está sonicando. Observar un descenso notable de la turbidez.
- (b) Centrifugar 10 minutos a 4000 rpm a 4 °C.
- (c) Recoger el sobrenadante y repartirlo en 3 tubos eppendorf.
- (d) Centrifugar a 13000 rpm y 4 °C durante 45 minutos.
- (e) Recoger el sobrenadante (extracto de betalactamasa) y conservar el sedimento a -30 °C (membranas), por si se necesita estudiar el perfil de OMPs.
- (f) Comprobar la actividad de betalactamasa de los extractos.: añadir a 5 µl de extracto, 5 µl de una solución de nitrocefina 250 µg/ml. La hidrólisis de esta cefalosporina cromógena debe observarse como un cambio de color de amarillo pálido a rojo en menos de un minuto.

3) Isoelectroenfoque (IEF)

- (a) Preenfoque a 15 °C, en el que se forma el gradiente de pH (75V a 2000V). El tiempo de preenfoco es de 10 minutos aproximadamente.
 - (i) Encender el aparato y seleccionar la temperatura de reposo a la temperatura del primer paso del IEF de las betalactamasas (15 °C)
 - (ii) Colocar una gota de agua desionizada (150 µl) sobre la parte superior de área del gel.
 - (iii) Sacar el PhastGel de su envoltorio y colocar con pinzas en una de las áreas par alo geles, procurando que quede una película de agua bajo el mismo libre de burbujas de aire. Alinear el gel en su compartimento y eliminar el exceso de agua. Quitarle la película protectora de plástico.
 - (iv) Bajar los electrodos y el dispositivo aplicador de muestras. Cerrar el compartimento.
 - (v) Presionar la tecla "SEP start/stop" y seleccionar el número de geles que se van a correr (1 o2). Presionar "do" para confirmar. Introducir el número del método correspondiente a IEF 3-9 (el 1 en nuestro caso) y presionar "do" para confirmar.

- (b) Aplicación de muestras: el voltaje desciende a 200V para evitar distorsión causada por contaminantes o proteínas poco solubles.
 - (i) Colocar un trozo de parafilm sobre el soporte con pocillo para las muestras, presionando para que los pocillos queden bien señalados.
 - (ii) Dispensar 4 μ l de cada muestra en el pocillo correspondiente.
 - (iii) Cargar el peine aplicador de las muestras.
 - (iv) Presionar "SEP pause/continue" cuando suene la alarma de aparato que indica que el preenfoco ha terminado. Abrir la tapa y colocar el peine en el dispositivo aplicador, a la altura del ánodo, cátodo o en el medio. Volver a cerrar la tapa y presionar "SEP pause/continue". Las muestras se aplicarán automáticamente en el momento programado.

 - (c) Enfoque: las proteínas migran hacia su punto isoelectrónico (500vh a 2000V).
 - (i) El peine aplicador subirá después de haber aplicado las muestras y comenzará el enfoque.
 - (ii) Al final sonará un alarma. Parar el método presionando "SEP star/stop". Presionar "do" para confirmar.
 - (iii) Sacar el gel inmediatamente y colocar en un placa de Petri vacía para teñirlo.
- 4) Tinción de los geles: Cubrir el gel con 200 μ l de nitrocefina 50 μ g/ml. Extender con pipeta a modo de asa. La presencia de bandas rojas en el extracto corrido en paralelo con betalactamasas conocidas indicará su pI. Es importante leer los resultados en menos de 2-3 minutos para evitar la difusión de bandas de nitrocefina hidrolizada.
- 5) Determinación del perfil de inhibición. Antes de teñir con nitrocefina cubrir el gel con papel de filtro impregnado en soluciones de ácido clavulánico (1mM en tampón fosfato potásico 100nM), cloxacilina (1mM en agua destilada) o EDTA (10mM en agua destilada), dejar actuar 10-20 segundos, retirar el papel de filtro y cubrir la superficie del gel con nitrocefina. Comparar el patrón de bandas del gel del control (no tratado con inhibidor).

4.4.2 PCR de genes *bla*

Se realizó detección de los genes que codifican las betalactamasas mediante PCR con cebadores específicos de los grupos de BLEE SHV, CTX-M-1 y CTX-M-9 (Tabla 9) El ADN bacteriano se obtuvo a partir de un cultivo puro crecido en agar Mueller-Hinton. Varias colonias se resuspendieron en 50 μ L de agua destilada estéril y se calentaron a 100 $^{\circ}$ C durante 10 minutos. Tras centrifugar a 13000 rpm durante un minuto se tomó 1 μ L de sobrenadante y se hizo una dilución 1/10 del extracto de ADN. Este se añadió a una mezcla maestra de 15 μ L cuya composición varió según el tipo de betalactamasa a detectar:

Para la PCR de CTX-M-9, la mezcla contenía:

- Tampón de PCR 1x.
- MgCl₂ 1.5 mM.
- dNTPs 200 μ M.
- 0.5 μ M de cada uno de los cebadores.
- 2.5 U de Taq polimerasa.

Mezcla maestra para PCR de CTX-M-1:

- Tampón de PCR 1x.
- MgCl₂ 1.5 mM.
- dNTPs 250 μ M.
- 1.25 pMol de cada uno de los cebadores.
- 2.5 U de Taq polimerasa.

Mezcla maestra para PCR de SHV:

- Tampón de PCR 1x.
- MgCl₂ 3 mM.
- dNTPs 400 μ M.
- 0.25 μ Mol de cada uno de los cebadores.
- 2 U de Taq polimerasa.

Protocolo seguido para la amplificación por PCR de CTX-M-9:

- Desnaturalización inicial: 94 $^{\circ}$ C durante 5 minutos.
- 35 ciclos:
 - Desnaturalización: 30 segundos a 95 $^{\circ}$ C.
 - Anillamiento: 30 segundos a 62 $^{\circ}$ C.
 - Extensión: un minuto y 15 segundos a 72 $^{\circ}$ C.
- Extensión final de 7 minutos a 72 $^{\circ}$ C.

Protocolo seguido para la amplificación por PCR de CTX-M-1:

- Desnaturalización inicial: 94 °C durante 5 minutos.
- 35 ciclos:
 - Desnaturalización: 1 minuto a 95 °C.
 - Anillamiento: 1 minuto a 64 °C.
 - Extensión: 2 minutos a 72 °C.
- Extensión final de 7 minutos a 72 °C.

Protocolo seguido para la amplificación por PCR de SHV:

- Desnaturalización inicial: 5 minutos a 94 °C.
- 35 ciclos:
 - Desnaturalización: 1 minuto a 94 °C.
 - Anillamiento: 1 minuto a 55 °C.
 - Extensión: 72 °C durante 1 minuto y 30 segundos.
- Extensión final de 7 minutos a 72 °C.

Una vez obtenido el producto de la PCR se realizó una electroforesis para visualizarlo en un gel de agarosa al 0.8%, TAE 1x y bromuro de etidio 0.5 µg/mL. En cada pocillo se cargaron 4µL de producto de PCR más 2 µL de marcador de avance (azul de bromofenol). Se utilizó el marcador de peso molecular "100 bp DNA Ladder".

4.4.3 Secuenciación de los genes que codifican BLEE

Se purificaron los productos de PCR específica de BLEE con el kit de purificación de ADN Sephaglas BandPrep de Pharmacia, siguiendo las instrucciones del fabricante para una secuenciación directa de estos. La secuenciación se llevó a cabo en la Unidad de Genómica-SCAI de la Universidad Córdoba. Posteriormente fueron analizadas las secuencias con el programa informático Chromas y a través de internet con el programa ClustalW2 del EMBL-EBI (*The European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute*)

4.5 Estudio de la relación clonal

Se emplearon 2 métodos de tipado molecular: REP-PCR (Repetitive extragenic palindromic Polimerase Chain Reaction) y PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis).

4.5.1 REP-PCR

Esta es una técnica de tipificación en la que se utilizan cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetitivas (secuencias REP) que se encuentran distribuidas en el cromosoma de muchas enterobacterias. Con esta técnica se amplifican las regiones que separan las secuencias REP, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones de ADN. El protocolo seguido fue el siguiente:

i) Extracción del ADN bacteriano:

Tomar varias colonias de un cultivo fresco del microorganismo resuspender en tubos con 2mL de agua destilada estéril hasta obtener, a una longitud de onda de 620 nm, una densidad óptica de 2. Transferir 50 μ L de esta suspensión a tubos de PCR de 200 μ L y calentar durante 10 minutos a 100 °C. Centrifugar la suspensión a 13000 rpm durante 1 minuto.

ii) Amplificación:

Preparar una mezcla maestra con:

- Buffer Taq 10x, 5 μ L.
- $MgCl_2$ 3 μ L (50 mM).
- dNTPs 4 μ L (5mM).
- 1 μ L de los cebadores (REP-1 y REP-2, 50mM. (ver Tabla 10).
- Taq polimerasa, 0.5U.

Añadir a un tubo de PCR 5 μ L del sobrenadante y 45 μ L de mezcla maestra. El programa de amplificación consistió en:

- Desnaturalización inicial: 3 minutos a 94 °C.
- 30 ciclos:
 - Desnaturalización: 1 minuto a 94 °C
 - Anillamiento: 1 minuto a 40 °C
 - Extensión: 8 minutos a 65 °C.
 - Extensión final de 16 minutos a 65 °C.

En cada tanda se incluyó la cepa control E. coli ATCC 25922 y un control negativo de PCR que contenía 5 μ L de agua destilada estéril y 42 μ L de mezcla maestra.

- iii) Visualización mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TBE 0.5x.
- a. En cada pocillo cargar 10 μ l de producto de PCR más 5 μ l de tampón de carga (azul de bromofenol).
 - b. Como marcador de peso molecular utilizar "100 bp DNA Ladder".
 - c. Condiciones de electroforesis: 5 horas a 90 W.
 - d. Introducir el gel en un baño con bromuro de etidio (500 mL de agua destilada más 50 mL de bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/mL) durante 20 minutos.
 - e. Aclarar el gel en un baño con agua destilada y mantener en un segundo baño con agua destilada durante 30 minutos.

Se utilizó el sistema de análisis digital de imágenes Kodak 1D EDAS 290 (Eastman Kodak) para comprobar los distintos patrones de REP-PCR obtenidos. Se consideraron patrones idénticos de REP-PCR y, por lo tanto, cepas pertenecientes al mismo clon, aquellos que presentaban el mismo número de bandas y en la misma localización. Fueron consideradas cepas relacionadas clonalmente aquellas cepas con una o dos bandas de diferencia en su patrón. Los aislamientos con más de dos bandas de diferencia en los patrones de REP-PCR fueron consideradas no relacionadas clonalmente.

4.5.2 Electroforesis en campo pulsante (PFGE)

Se llevó a cabo en un equipo CHEF-MAPPER mediante el protocolo descrito a continuación:

PULSENET (PFGE para *E.coli*)

DÍA 0

- Descongelar los aislados y sembrarlos en agar sangre.
- Incubar 14-18h a 37 °C.

DÍA 1

Suspensiones

- Encender el baño a 55 °C y el espectrofotómetro.
- Preparar el TE, para un litro:
 - Tris-HCl 10mM, pH8.

- EDTA 10mM, pH8.
- Preparar SDS al 20% y precalentarlo a 55 °C.
- Preparar agarosa Pronadisa al 1%.
 - Pesar 0.2g de agarosa Pronadisa y resuspender en 19ml de TE. Fundir en el microondas y cuando esté ya disuelta, dejar 5 minutos a 55 °C.
 - Añadir 1ml de SDS al 20% y mezclar bien.
 - Mantener la mezcla en el baño a 55 °C hasta su uso.
- Preparar tantos tubos estériles de 3ml como microorganismos y una bandeja con hielo. Añadir 2ml de buffer de suspensión:
 - Tris-HCl 100mM, pH8.
 - EDTA 100mM, pH8.
- Ajustar el espectrofotómetro para 610nm de longitud de onda. Inocular cada aislado hasta conseguir 1.35 de absorbancia (rango 1.3-1.4). Mantener en hielo una vez ajustados.

Preparar los bloques

- Descongelar proteinasa K (20mg/ml) y mantenerla en hielo. Hacen falta 20 µl por aislado.
- Transferir 400 µl de los aislados ya resuspendidos a tubos eppendorfs e incubar en estufa unos minutos.
- Añadir 20 µl de proteinasa K a cada aislado y mezclar suavemente con pipeta.
- Añadir 400 µl de agarosa y mezclar suavemente.
- Preparar los bloques y dejarlos solidificar 10-15 min. a temperatura ambiente o 5 min. a 4 °C.

Lisis

- Preparar tantos tubos falcon como aislados y 25 µl de proteinasa K (20mg/ml) por aislado.
- Añadir 5ml de solución de lisis a cada tubo falcon.
- Añadir 25 µl de proteinasa K a cada tubo.
- Introducir los bloques en la suspensión de lisis

Material y métodos

- Incubar los tubos en un baño a 50 °C en agitación vigorosa (100U/min) durante 1.5-2h con el nivel del agua por encima del nivel del buffer de lisis.

Lavados

- Encender un baño con agitador a 50 °C y precalentar agua ultrapura y buffer TE a 50 °C.
- Descartar la solución de lisis y lavar los bloques con 10ml de agua, dejándolo en agitación suave en el baño a 50 °C 10-15 min. Lavar una segunda vez con agua.
- Lavar 4 veces con 10ml de TE, dejando en agitación suave en el baño a 50 °C 10-15min.
- Descartar el TE y añadir 5ml de TE. Se puede parar en este paso y guardar los bloques a 4 °C para hacer la restricción al día siguiente.

DÍA 2

Restricción

- Encender un baño a 37 °C.
- Preparar buffer de restricción diluyendo 20 µl de buffer 10x en 180µl de agua ultrapura (200µl por aislado).
- Cortar un bloque por aislado y añadirlo al buffer e incubarlos a 37 °C durante 5-10 minutos.
- Preparar la solución de restricción (por aislado):
 - 1 aislado.
 - 175µl de agua ultrapura.
 - 20µl de buffer 10x.
 - 5µl de *Xba*I.
- Retirar el buffer con pipeta y añadir 200µl de solución de restricción.
- Incubar en el baño a 37 °C durante 2h.

Electroforesis

- Preparar 2 litros de TBE 0.5X y guardar a 4 °C hasta su utilización en la electroforesis.
- Disolver en microondas agarosa para PFGE al 1% en TBE 0.5X (170ml TBE 0.5X y 1.7g de agarosa).
- Preparar el molde para el gel. Para ello encajar la bandeja en el soporte, apretar las tuercas y colocar el peine.
- Verter la agarosa en el molde dejando una pequeña cantidad en la estufa de 50 °C o en un baño a 50 °C para sellar posteriormente los bloques.
- Retirar los bloques de la solución de restricción y pasarlos a tubos eppendorfs con 1ml de TBE 0.5X.
- Estabilizar a 4 °C durante 15min aproximadamente.
- Mientras tanto preparar el equipo CHEF-DR® III:
 - Verter los 2 litros de TBE en la cubeta.
 - Encender el interruptor del CHEF.
 - Encender el interruptor de la bomba y ajustar en la posición 70.
 - Encender el refrigerador y ajustar a 14 °C.
 - Esperar a que el TBE alcance la temperatura de 14 °C asegurándonos de que el TBE circula bien por las gomas y que no hay burbujas.
 - Ajustar las condiciones de electroforesis.

Pulsos pulsenet

- Tiempo inicial: 2,2 segundos.
 - Tiempo final: 63,8 segundos.
 - Voltaje: 6 V.
 - Ángulo: 120°.
 - Tiempo de duración: 18-19 horas.
-
- Retirar el peine e ir colocando los bloques ayudándonos con la microespátula, de forma que no queden burbujas.
 - Sellar los pocillos con el resto de agarosa.

- Dejar enfriar.
- Desmontar el molde con cuidado sin separar el gel de la bandeja negra y limpiar los restos de agarosa.
- Colocar el gel con la bandeja negra en el centro de la cubeta aplastándolo para que no flote.
- Cerrar la tapa y poner en marcha el sistema pulsando " STAR RUN"

DÍA 3

Tinción

- Apagar los interruptores.
- Teñir el gel en una cubeta con bromuro de etidio (1µg/ml). Mientras tanto drenar el TBE, lavar y secar todo el material.
- Lavar el gel en una cubeta con agua destilada. Visualizar el gel con transiluminador de luz UV y fotografiarlo.

Interpretación de los resultados de PFGE

Para compensar las diferencias o las distorsiones que se pudieran haber generado durante la electroforesis de los distintos geles, estos se alinearon y normalizaron mediante un patrón de referencia externo. El software utilizado fue Fingerprinting 3.0 (BioRad, Hercules, CA, USA). Los dendogramas se generaron utilizando el método de grupos de pares no ponderados (UPGMA) con una tolerancia del 1% y aplicando un índice de Dice del 85%.

4.5.3 Multi-Locus Sequence Typing

La técnica de MLST se llevó a cabo en el Laboratorio de Referencia de *E. coli*, en Lugo (LREC, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela). Brevemente, esta técnica de tipado molecular se fundamenta en el análisis de secuencias intragénicas de ADN correspondientes a 7 genes altamente conservados o "housekeeping". A cada aislado analizado se le asigna un perfil de 7 números que indica las variables alélicas de los genes analizados. Este perfil se asocia a su vez a un tipo de secuencia (sequence type o "ST"). Las secuencias, cebadores y condiciones de amplificación se encuentran en la página web: www.mlst.net.

4.6 Análisis de filogrupos

El análisis de filogrupos de las cepas de origen clínico y alimentario se llevó a cabo mediante PCR múltiple de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento de ADN *tspEC2*, según el método descrito por Clermont y cols (48). La interpretación de los filogrupos y subgrupos se realizó según el esquema descrito por Branger y cols (142).

En la Tabla 11 se describen los cebadores empleados en la caracterización del grupo filogenético. El protocolo seguido para la amplificación fue el siguiente:

- Desnaturalización inicial: 94 °C durante 5 minutos
- 30 ciclos:
 - Desnaturalización: 30 segundos a 95 °C
 - Anillamiento: 30 segundos a 59 °C
 - Extensión: 7 segundos a 72 °C.
- Extensión final de 5 minutos a 72 °C.

4.7 Análisis de Factores de Virulencia

Se determinó la presencia de un grupo de genes codificantes de factores de virulencia (FV) en una selección de ECBLEE integrada por todos los aislados productores de betalactamasas SHV-12 y CTX-M-15 de origen clínico y de muestras cárnicas.

El análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli* (LREC), en Lugo. Los genes codificantes de factores de virulencia amplificados en este estudio fueron: para *E. coli* productor de SHV se determinó la presencia de los siguientes genes de virulencia mediante PCR: *afa/draBC*, *iucD* (aerobactina), *sfa/focDE*, *fimH*, *neuC* (K1), *fim78**, *ibeA*, *cdt**, *cvac** (V), *tsh*, *pap*, *hly* y *cnf*. Los genes marcados con un asterisco no se determinaron en *E. coli* productor de CTX-M-15. En la Tabla 13 se encuentran los cebadores utilizados para la amplificación de estos factores de virulencia, tamaño de fragmento esperado y las temperaturas de anillamiento empleadas. Se consideró ExPEC a aquellos aislados que presentaban 2 o más genes del grupo: *afa/fraBC*, *sfa/focDE*, *iucD*, *ibeA* y *papC*.

El protocolo seguido para la amplificación de genes que codifican para factores de virulencia fue el siguiente:

- Desnaturalización inicial: 94 °C durante 3 minutos
- 35 ciclos:
 - Desnaturalización: 1 minuto a 94 °C
 - Anillamiento: 40 segundos.
 - Extensión: 2 minutos a 72 °C
- Extensión final de 3 minutos a 72 °C.

4.8 Serotipado

El serotipado está basado en la identificación de los antígenos somáticos "O", capsulares "K" y flagelares "H". Al determinar los genes de virulencia se establece el patotipo de una cepa, que puede combinarse con la determinación del serotipo y así obtenerse el seropatotipo. La determinación del antígeno O de todas las cepas de *E.coli* productoras de SHV y CTX-M-15 fue realizada siguiendo la metodología originalmente descrita por Guinée y cols. en 1972 (143) y modificada posteriormente por Blanco y cols (144).

El establecimiento del antígeno O de *E.coli* conlleva enfrentar las cepas con antisueros capaces de reaccionar específicamente con los antígenos O1 a O181 de *E.coli*. Dichos antisueros se obtuvieron en el LREC inmunizando conejos y fueron adsorbidos para eliminar las reacciones cruzadas causantes de falsos positivos. Los 173 antisueros O monovalentes se repartieron en un total de 25 antisueros polivalentes nombrados del A al X. La dilución final de los antisueros individuales en el polivalente coincide con la dilución de ensayo (1/40 o 1/80).

Preparación de las suspensiones bacterianas

- Sembrar las cepas en TSA incubando 18h a 37 °C.
- Suspender las bacterias en 2 ml de solución salina (0.85% ClNa, p/v) y ajustar la concentración bacteriana al 6 de McFarland (1.8×10^9 bacterias/ml). Realizar este paso por duplicado.
- Calentar un tubo a 100 °C/1h para desenmascarar el antígeno O.

- Una vez enfriado, añadir a cada tubo 2 ml de solución salina formalinizada (0.5%, v/v) conteniendo violeta de genciana (0.005%, p/v). Conservar las suspensiones bacterianas a 4 °C durante un máximo de dos semanas.

Titulación de los antisueros O

Los antiueros O se titularon frente a las cepas control para escoger la dilución de ensayo, utilizando placas de microtitulación de 96 pocillos con el fondo en "V."

- Poner 90 µl de solución salina en el primer pocillo de cada fila y 50 µl en los restantes 11 pocillos de la placa.
- Añadir 10 µl del antisuero monovalente al primer pocillo, mezclar y hacer diluciones seriadas (1/2). Para ello transferir 50 µl del primer pocillo al siguiente, mezclar y repetir la operación hasta el décimo pocillo. Los pocillos nº 11 y 12 de cada fila se utilizan como controles negativos, desechando los 50 µl que sobran después de mezclar en el pocillo nº 10.
- Añadir 50 µl de la suspensión bacteriana calentada, formalinizada y teñida a los 12 pocillos de cada fila, empezando por el pocillo nº 12 y avanzando hasta el nº 1. Tapar la placa de microtitulación, incubar a 37 °C/18h y realizar la lectura. La dilución final del antisuero en el primer pocillo será de 1/20.
- Escoger como dilución de ensayo 1/80 cuando den títulos $\geq 1/640$ con la cepa control. Si el título es inferior a 1/640, emplear como dilución de ensayo 1/40.

Determinación presuntiva del serogrupo O

- En primer lugar se descarta que la cepa de *E.coli* sea autoaglutinante.
- Enfrentar las suspensiones calentadas a 100 °C/1h con los 25 antisueros polivalentes. Para ello, añadir a 50 µl de cada antisuero, 50 µl de la suspensión bacteriana calentada, formalinizada y teñida. Tapar la placa e incubar a 37 °C/18h,
- Si la cepa aglutina con alguno de los antisueros polivalentes empleados, se realiza el mismo procedimiento con los antisueros monovalentes incluidos en el polivalente correspondiente. Realizar la confirmación del serogrupo con las cepas que hayan sido aglutinadas por uno o más antisueros O monovalentes. Si la cepa no aglutina con ningún antisuero se considera no tipable (NT).

Confirmación del serogrupo O: Titulación

- Poner 50 µl de solución salina en todos los pocillo de cada fila, excepto en el nº1.
- Añadir a los pocillos nº 1 y nº 2 de cada fila 50 µl de la dilución de ensayo del antisuero O correspondiente. Hacer diluciones seriadas (1/2) transfiriendo 50 µl de la mezcla del pocillo nº 2 al nº 3, mezclando y repitiendo la operación hasta llegar al pocillo nº 10. Utilizar los pocillos nº 11 y nº 12 como controles negativos, desechando los 50 µl que sobran después de mezclar en el pocillo nº 10.
- Añadir 50 µl de la suspensión bacteriana a los 12 pocillos de cada fila, empezando por el nº 12 y avanzando hasta el nº 1. Tapar las placas e incubar a 37 °C/18h.
- Realizar la lectura de los resultados determinando así los títulos.

También se realizó PCR alelo específica de O25b en este grupo de cepas y adicionalmente, de O25a en las cepas productoras de CTX-M-15. Los cebadores utilizados se encuentran en la Tabla 12.

	Co (mM)	Cf (mM)	Vp (µl)
Tampón de PCR	5x	1x	6
MgCl₂	25 mM	1.5 mM	1.8
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.6
Cebadores-F	300 µM	5 µM	0.5 µl
Cebadores-R	300 µM	5 µM	0.5 µl
Taq polimerasa	5 U	0.03 U	0.2 µl

Tabla 17. Mezcla maestra utilizada para realizar la PCR del alelo O25. Co:Concentración inicial; Cf: Concentración final; Vp: Volumen parcial

Protocolo de PCR seguido para la amplificación:

- Desnaturalización inicial: 94 °C durante 3 minutos
- 35 ciclos:
 - Desnaturalización: 1 minuto a 94 °C.
 - Anillamiento: 40 segundos 55 °C.
 - Extensión: 2 minutos a 72 °C.
- Extensión final de 3 minutos a 72 °C.

4.9 Análisis de plásmidos

El análisis de plásmidos se realizó en un grupo (n=6) de aislados pertenecientes al grupo filogenético A1, caracterizados por producir BLEE del tipo CTX-M-15, siguiendo la metodología descrita a continuación.

4.9.1 Conjugación

Día 1:

- Sembrar la cepa receptora *E.coli* J53 Azida R (Pro- y Met-) y las cepas donantes.

Día 2

- Inocular la cepa donante en un tubo de ensayo de 10ml de capacidad con 4 ml de medio LB en agitación durante 18-20 horas a 37 °C. Se puede añadir CTX o CAZ a una concentración de 2µg/ml para estimular la producción de betalactamasa.
- Inocular la cepa receptora en 4 ml de LB en agitación durante 18-20 horas a 37 °C.

Día 3

- Preparar las siguientes mezclas de conjugación:
 - Control Receptor (R): 0.5 ml R + 4.5 ml de LB.
 - Control Donante (D): 0.5 ml D + 4.5 ml de LB.
 - Prueba: 0.5 ml R + 0.5 ml D + 4 ml LB.
- Incubar estas muestras en estático a 37 °C durante 18-20 horas.

Día 4

- Inocular el tubo de ensayo de la prueba en las siguientes placas:
 - MHA + azida [200 µg/ml] + CTX [2µg/ml].
 - MHA + azida [200 µg/ml] + CAZ [2µg/ml].
- Inocular 100 µl de la muestra y dilución 1/10. Si se obtuvieron altos inóculos, inocular sólo 1/10 y 1/100. Inocular también el tubo control R en placas con CAZ y en CTX y el tubo control D en azida. Incubar 24 h a 37 °C.

Día 5

- Inocular las colonias que crecen en los medios de MHA+azida+CAZ y MHA+azida+CTX en placas de medio mínimo deficiente en prolina y metionina. Inocular también en MHA para obtener masa.
- Realizar la lectura de la siguiente manera:

- Si la cepa crece se trata del donante.
- Si no crece puede tratarse del receptor o del transconjugante puesto que el receptor es deficiente en prolina y metionina.

4.9.2 Transformación

4.9.2.1 Extracción de ADN plasmídico: método KADO

La extracción de plásmidos se llevó a cabo mediante el método descrito por Kado y Liu en 1981 (145).

1. Inocular 4 tubos de 10 ml con 2 ml de LB por cada microorganismo e incubar 18 h a 37 °C.
2. Preparar un baño a 58 °C.
3. Pasar 1.5 ml de cada tubo a un tubo eppendorf.
4. Centrifugar durante 5 minutos a 14000 rpm.
5. Decantar el sobrenadante y eliminar el resto con pipeta.
6. Resuspender el pellet en 20 µl de Kado Buffer. Cuando sea necesario usar un vórtex para homogeneizar.
7. Preparar la solución de lisis.
8. Añadir 100 µl de la solución de lisis. No vortear. Mezclar suavemente por inversión, varias veces y muy despacio. Si es posible, hacerlo con todos los tubos a la vez.
9. Poner en el baño a 58 °C durante 27 minutos.
10. Utilizando guantes, añadir lentamente 100 µl de fenol/cloroformo. Mezclar por inversión muy despacio varias veces, hasta que la mezcla quede homogénea y adquiera color blanco.
11. Centrifugar durante 45 minutos a 13000 rpm.
12. Poner la centrífuga a 4 °C.
13. Tomar 90 µl del sobrenadante de cada uno de los cuatro tubos con puntas estériles desmochadas y juntarlo en un tubo eppendorf. En total tendremos 360 µl.
14. Añadir 400 µl de isopropanol. Mezclar suavemente por inversión 2-3 veces.
15. Centrifugar 30 minutos a 13000 rpm en frío.
16. Decantar el sobrenadante.

17. Añadir 500 µl de etanol al 70% sin resuspender y sin tocar el pellet y volver a centrifugar 15 minutos a 13000 rpm.
18. Decantar el sobrenadante y retirar el exceso con una pipeta. Dejar secar a temperatura ambiente.
19. Resuspender el pellet con 20 µl de agua con RNasa y golpear suavemente hasta eluirlo completamente.

4.9.2.2 Inducción de electrocompetencia en células receptoras

1. Preparar el preinóculo en 5 ml de LB. Dejar crecer toda la noche a 37 °C en agitación.
2. A la mañana siguiente, añadir los 5 ml a 500 ml de LB y dejar crecer en agitación hasta que alcancen una densidad óptica de 0.6-0.6 a 600 nm.
3. Poner en hielo 10 minutos. Alicuotar en 10 tubos falcon de 50 ml.
4. Centrifugar los tubos falcon durante 20 minutos a 4200 rpm.
5. Decantar el sobrenadante, lavar con 50 ml de agua destilada estéril fría y centrifugar durante 20 minutos a 4200 rpm.
6. Decantar el sobrenadante y concentrar cada 2 tubos falcon en uno. Volver a lavar estos tubos con 50 ml de agua destilada estéril fría y volver a centrifugar 20 minutos a 4200 rpm.
7. Retirar el sobrenadante y volver a lavar los falcon con 50 ml de agua destilada estéril con glicerol al 10%. Centrifugar 20 minutos a 4200 rpm.
8. Concentrar cada 2 tubos y medio en uno y lavar con agua destilada estéril con glicerol al 10%.
9. Centrifugar 20 minutos a 4200 rpm. Retirar el sobrenadante y resuspender en 800-1000 µl de agua destilada estéril con glicerol al 10%.
10. Alicuotar tubos eppendorfs 50 µl, 100 µl y 200 µl y congelar a -80°C.

4.9.2.3 Transformación por electroporación

1. Preparar medio rico SOC:
2. Esterilizar en autoclave.
3. Añadir 5 ml de cloruro magnésico 2M y 20 ml de glucosa 1M estériles.

4. Poner 1 μ l de plásmido en un eppendorf con 50 μ l de células DH10B electrocompetentes. Mantener en hielo durante todo el proceso.
5. Seleccionar el programa Ec2 (Programa para *E. coli*, de 2.50 kV por pulso) en el Micropulser y dar un pulso.
6. Añadir rápidamente 800 μ l de medio SOC y pasar a un tubo de 10 ml.
7. Incubar a 37 °C durante una hora en agitación.
8. Sembrar en placas selectivas, en este caso de MH con CTX 2 μ g/ml.

4.9.3 Comprobación de cepas transconjugantes y transformantes

A las cepas transconjugantes y transformantes se les realizó PCR de genes *bla* SHV, grupo CTX-M-1 y grupo CTX-M-9 siguiendo los protocolos descritos anteriormente para comprobar la presencia de los plásmidos.

4.9.4 Restricción de ADN plasmídico

4.9.4.1 Digestión de plásmidos con S1 exonucleasa

La digestión de plásmidos con exonucleasa S1 se utiliza habitualmente para estimar el tamaño de los mismos. Esta enzima de restricción produce un solo corte en la molécula de ADN con lo que provoca su linealización. El plásmido ya linealizado puede someterse a electroforesis con un marcador de peso molecular adecuado, transferirse a membrana de nitrocelulosa e hibridarse con sondas específicas. Se siguió el protocolo descrito a continuación:

Día 1. Digestión del marcador de peso molecular (*Staphylococcus aureus* NCTC 8325) con la enzima de restricción *Sma*I:

- Diluir el buffer que se encuentra a 10x con agua miliQ hasta obtener una concentración 1x. Se necesitan 200 μ l de buffer 1x por cada microorganismo.
- Poner en un eppendorf el bloque y los 200 μ l de buffer e incubar durante 20 minutos en un baño a 30 °C.
- Pasar el bloque a otro eppendorf con 198 μ l de buffer 1x y 2 μ l de enzima, que en este caso será *Sma*I. Incubar toda la noche a 30 °C en un baño con agitación.

Día 2. Digestión de los plásmidos con exonucleasa S1:

- Encender un baño a 37 °C.
- Preparar un eppendorf por cada bloque a digerir.
- En cada eppendorf poner:
 - 180 µl de agua miliQ + 20 µl de buffer 10x + el bloque.
- Incubar a 37 °C, en baño sin agitación, durante 20 minutos.
- Retirar la solución anterior con una pipeta y añadir en cada eppendorf:
 - 170 µl de agua miliQ + 20 µl de buffer 10x + 10 µl de enzima S1 a una concentración 1U / µl.

(El stock de S1 se encuentra a una concentración mayor. Diluir en S1buffer (1x) para obtener 1 U/µl. El S1buffer puede diluirse a 1x con agua miliQ).

- Incubar en un baño sin agitación a 37 °C durante una hora.
- Retirar la solución anterior y añadir 1 ml de buffer de suspensión de pulsenet (Tris-HCl 100mM pH8 + EDTA 100 mM pH8) a cada eppendorf para parar la reacción. Incubar 20-30 minutos en un baño a 37 °C.
- Retirar la solución anterior y añadir a cada eppendorf 1 ml de TBE 0.5x. Poner en nevera durante 15-20 minutos.
- Cargar los pocillos del gel y seguir el protocolo de electroforesis de pulsenet (24 horas). Los pulsos que aplicamos son los siguientes:
 - 5-25 s-----6 horas.
 - 30-45 s-----18 horas.
 - 6V/cm.
 - Ángulo: 120°.
- Teñir en un baño con bromuro a concentración 1mg/ml durante 10-15 minutos.
- Seguir el protocolo de Southern en el punto 2 (procesamiento del gel).

4.9.4.2 Digestión de plásmidos con *HpaI*

Para comparar los plásmidos entre sí se utilizó el patrón de bandas generado por la restricción plasmídica de los mismos con la enzima *HpaI*. El protocolo seguido para la digestión de plásmidos con *HpaI* es el siguiente:

- Encender un baño a 37 °C y preparar un tubo eppendorf por cada plásmido que se vaya a digerir.
- Añadir a cada tubo una mezcla con 4 µl de buffer de la enzima a una concentración 10X, 4 µl de la enzima y una cantidad de plásmido estimada a partir de los resultados de la extracción plasmídica. Completar con agua destilada hasta un volumen final de 40 µl.
- Incubar en un baño sin agitación a 37 °C durante 2 horas.

Se preparó previamente la sonda para hibridación haciendo una PCR estándar del gen *bla*_{CTX-M-15} con nucleótidos marcados con digoxigenina (PCR DIG Labeling Mix, Roche) que nos permitió detectar la hibridación por quimioluminiscencia.

Electroforesis

- Podemos separar los fragmentos de ADN utilizando enzimas de restricción o correr ADN sin digerir.
- En el gel debemos correr:
 - Marcador de peso molecular.
 - Control positivo.
 - Control negativo.
 - Las muestras problema.
- Correr el gel hasta que las bandas estén bien separadas.

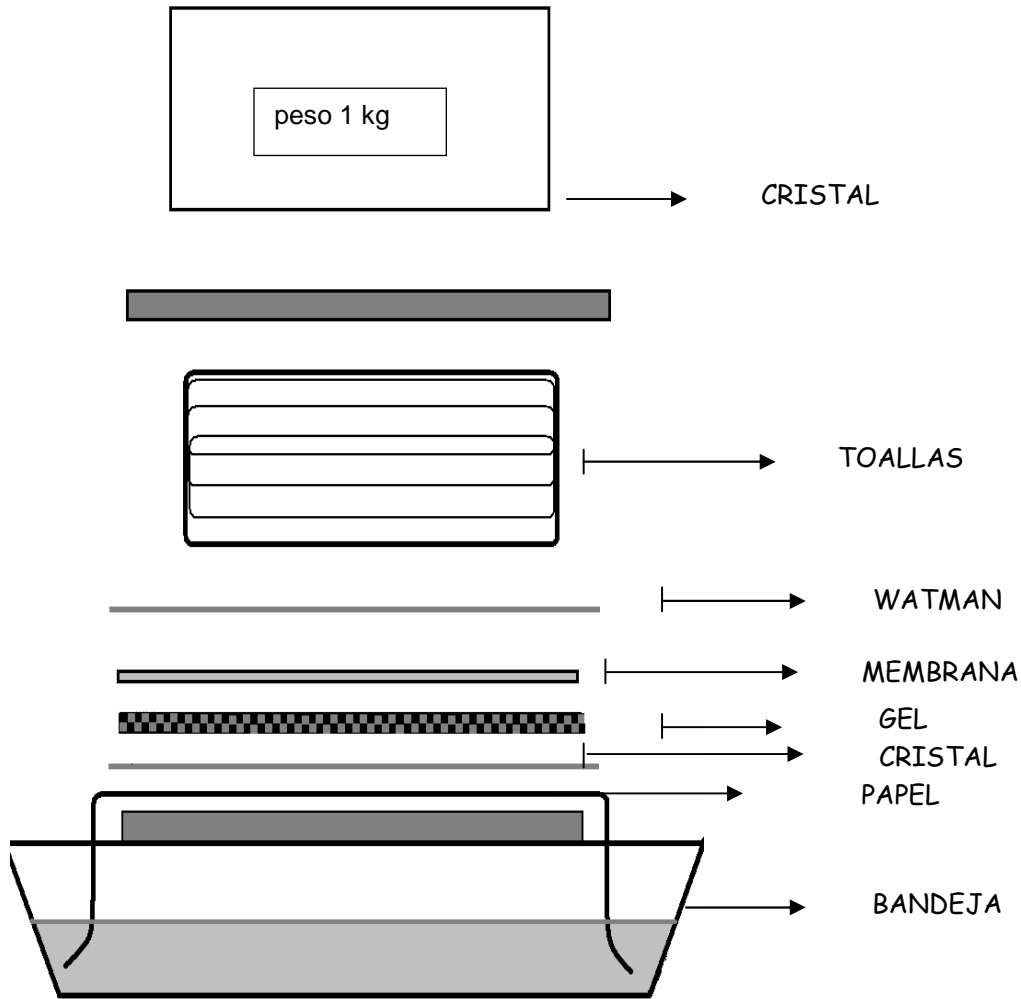
1. Procesamiento del gel

- Cortar el gel en la esquina derecha para diferenciar sus dos caras.
- Colocar el gel en una bandeja con solución de depurinación (preparada en el momento) ± 10 minutos a temperatura ambiente en agitación suave (hasta que el frente se observe de color amarillo).

- Retirar la solución anterior y añadir solución desnaturalizante. Mantener 30 minutos a temperatura ambiente.
- Retirar solución anterior y añadir solución de neutralización. Mantener 30 minutos a temperatura ambiente.

2. Transferencia

- Preparar:
Bandeja.
 - Dos hojas de papel de filtro whatman del mismo tamaño que el gel.
 - Membrana (del mismo tamaño que el gel y con el extremo derecho cortado al igual que el gel).
 - Papel de filtro plegado (aproximadamente de la misma anchura que el gel).
 - Dos cristales.
 - Toallas de papel.
 - Pinzas.
 - Tijeras.
 - Parafilm o papel aluminio.
 - Peso 0.5 KG.
 - Solución 20 X SSC.
 - SSC: 0.3 M cloruro sódico, 0.003M citrato sódico.
- Montar el dispositivo según se aprecia en el esquema siguiente y teniendo en cuenta que el gel debe colocarse boca abajo:



- Una vez montado el dispositivo, cubrir con parafilm o papel aluminio la parte de papel de filtro que no está en contacto con el gel para evitar evaporación.
- Dejar a temperatura ambiente toda la noche.

3. Fijación

- Desmontar el dispositivo, dar la vuelta al gel con la membrana y señalar la posición de los pocillos en la membrana con lápiz.
- Desechar el gel y guardar la membrana en papel whatman.
- Fijar los ácidos nucleicos a la membrana por radiación UV en el sistema UVC500 Crosslinker (Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA).
- Mantener 2 horas en estufa a 50 °C.

4. Prehibidación

- Encender el horno Hybrigene y llevar a la temperatura de hibridación, 42 °C.
- Añadir a un tubo de hibridación 30 ml de la solución de hibridación *DIG EASY Hyb (DIG High primer DNA Labelling and Detection Starter Kit II)*.
- Introducir la membrana con el ADN hacia la parte interior, nunca hacia el cristal.
- Dejar durante 2-3 h prehibridando.

5. Hibridación

- Hervir durante 5 minutos : 300 µl de solución DIG EASY y 5 µl de sonda marcada.
- Vaciar el tubo de hibridación y añadir 15-20 ml DIG EASY (ya precalentado) + la sonda hervida previamente.
- Incubar toda la noche a 42 °C en agitación en el horno Hybrigene.

6. Lavados para eliminar el exceso de sonda

A la mañana siguiente realizar:

- Dos lavados durante 5 minutos a temperatura ambiente con una solución que contenga SSC 2X y SDS 0.1 % .
- Precalentar el Hybrigene y la solución para el 2º .
- Un lavado durante 20 minutos a 68 °C con una solución con SSC 0.5 X y SDS 0.1 %.

7. Bloqueo

- Añadir 20ml de solución bloqueo y dejar 30 minutos a temperatura ambiente dentro del Hybrigene (puerta abierta).

8. Detección inmunológica

- Centrifugar durante 5 minutos a 1000 rpm el recipiente que contiene anticuerpo anti digoxigenina marcado con fosfatasa alcalina (Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments, Roche).
- Del sobrenadante tomar 3 µl y añadir a 30 ml de solución de bloqueo.

- Mantener 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar 2 veces durante 15 minutos a t^a ambiente con Washing buffer.
- Mantener en Buffer Detection durante 15 minutos.
- Envolver la membrana en una funda de plástico y añadir el sustrato de la fosfatasa alcalina (CSPD). Cerrar los extremos e incubar 5 minutos en oscuridad.
CSPD: Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)phenyl phosphate.
- Quitar el exceso de CSPD con ayuda de un papel de filtro presionando sobre la transparencia y extendiendo hacia los extremos con suavidad.
- Recortar al tamaño deseado , sellar la transparencia y dejar 10-15 minutos a 37 °C.

9. Exposición y revelado (siempre en oscuridad)

- Poner la película , exponer 30 minutos y revelar:
 1. Revelador.
 2. H₂O.
 3. Fijador.
 4. H₂O.

Repetir la exposición si se desea.

4.9.5 Caracterización del entorno genético de *bla*_{CTX-M-15}

La presencia de los genes generalmente asociados a la región MDR (Multi-Drug-Resistant) se determinó en los transconjugantes y transformantes mediante amplificación por PCR con cebadores específicos previamente publicados de las regiones de unión 1-6 y de los genes de resistencia a antimicrobianos *tetA*, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM-1} (146) y *aac*(6')-1b-cr (147). La presencia de los genes *aac*(3)-II y *catB3*-3' se determinó con cebadores específicos diseñados para este estudio (Tabla 14).

Posteriormente los plásmidos extraídos de transconjugantes y transformantes que habían sido digeridos con la enzima de restricción *HpaI* y transferidos a membranas, se hibridaron con sondas marcadas de *bla*_{CTX-M-15}, *aac*(6')-Ib y *aac*(3)-II. Además, se investigó mediante PCR y posterior secuenciación la presencia de las secuencias de inserción IS26 (148) e *ISEcp1* (146), normalmente localizadas aguas

arriba del gen, así como la región del promotor putativo con los cebadores *bla/PF* y *PR*. Los cebadores utilizados para la amplificación se encuentran en la Tabla 14. La mezcla maestra de las reacciones de PCR fue las siguientes:

- Tampón de PCR 1x.
- MgCl₂ 3 mM.
- dNTPs 400 μM.
- Cebador F: 0.25μM.
- Cebador R: 0.25μM.
- 1 U de Taq polimerasa.

4.9.6 Extracción de ADN plasmídico mediante el método de Kieser

Se realizó extracción de ADN plasmídico mediante el método de Kieser (149) para estimar/comparar el tamaño de los plásmidos de un grupo de cepas productoras de SHV-12. Se siguió el protocolo descrito a continuación:

De una placa fresca de MHA recoger media asa de biomasa y resuspender completamente en 500 μl de solución de Kieser. Añadir 250 μl de solución de lisis y agitar enérgicamente.

- Incubar durante 30 minutos a 55 °C.
- Enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Añadir 250 μl de fenol-cloroformo ácido y agitar enérgicamente.
- Centrifugar a 12.000 rpm durante 12 minutos a 4 °C.
- Recuperar 200 μl de la fase superior que contiene el ADN.
- Separar por electroforesis cargando aproximadamente 40 μl en gel de agarosa al 0.7% en TBE 1X. Seleccionar un tiempo de electroforesis de 18 horas a 40 V.
- Teñir el gel en una solución de agua destilada con una concentración de 0.5 μg de bromuro de etidio por ml de agua durante 30 minutos. Posteriormente lavar en agua destilada y visualizar con transiluminador.

4.9.7 Caracterización del grupo de incompatibilidad plasmídico: tipado y subtipado.

Para determinar el grupo de incompatibilidad plasmídica se siguió la metodología PCR-Based Replicon Typing (PBRT) descrita por Carattoli y *cols.* en 2005

(150). Se trata de un método basado en la amplificación por PCR simple (3 reacciones) o múltiple (5 reacciones) y posterior secuenciación, de los replicones de los plásmidos, utilizando para ello 18 parejas de cebadores (Tabla 15). Permite la identificación de los grupos de incompatibilidad plasmídica principales: FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Igama, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F y FIIA.

Los plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad I1 se subtiparon mediante la técnica de pMLST (Plasmid Multi Locus Sequence Typing) descrita por García Fernández y cols. (50). Se basa en la obtención de un perfil alélico de 5 genes (rep1I, ardA, trbA, sogS, pilL) mediante amplificación por PCR simple (cebadores en Tabla 16) y posterior secuenciación, que otorga un ST o secuenciotipo. El grado de discriminación obtenida es similar al obtenido mediante la técnica de Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), basada en la restricción enzimática de los plásmidos y comparación del tamaño de los fragmentos obtenidos. Los resultados se analizan en la página web siguiente:

<http://pubmlst.org/plasmid/primers/incI1.shtml>.

4.10 Recogida de datos epidemiológicos

Por cada cepa de origen clínico seleccionada se rellenó una hoja de datos epidemiológicos (anexo 2) que incluía:

- Número de identificación de la muestra.
- Sexo y edad del paciente.
- Tipo de muestra.
- Especie a la que pertenecía el microorganismo.
- Fecha de recogida.
- Origen de la infección (nosocomial o comunitario).

También se recogieron datos sobre el número total de aislamientos en el laboratorio de Microbiología durante el período de estudio así como la procedencia intra o extrahospitalaria para determinar la frecuencia de producción de BLEE en el territorio y período estudiado. Dos muestras del mismo paciente se incluyeron como casos distintos cuando las muestras se obtuvieron con una diferencia de tiempo mayor o igual a 30 días. Se definieron las siguientes categorías:

- Caso de origen nosocomial: Cultivo positivo obtenido de un paciente hospitalizado durante un mínimo de 48 horas.

- Caso relacionado con la atención sanitaria: Cultivo positivo obtenido de un paciente hospitalizado durante menos de 48 horas o en el momento de la admisión si el paciente cumplía alguno de los siguientes criterios:
 1. Recibir terapia intravenosa domiciliaria, cura de heridas o cualquier tipo de atención sanitaria por parte de personal sanitario, familia o amigos. Haberse administrado tratamiento intravenoso en los 30 días previos a la inclusión en el estudio.
 2. Haber sido atendido en hospitales, unidades de hemodiálisis o haber recibido tratamiento quimioterápico en los 30 días previos a su inclusión en el estudio.
 3. Haber estado hospitalizado durante 2 o más días en los 90 días previos a la inclusión en el estudio.
 4. Residir en residencias de ancianos.

- Caso comunitario estricto: Cultivo positivo obtenido de un paciente en el momento de ingreso o en menos de 48 horas desde el mismo y que no cumple ningún criterio de los casos relacionados con la atención sanitaria.

4.11 Tamaño muestral

Decidimos incluir un mínimo de 75 aislados clínicos que, en base a los datos de un estudio previo realizado en nuestra área y en Pittsburgh proporcionó un número suficiente de aislados de adquisición comunitaria, relacionada con los cuidados sanitarios y nosocomial, y además un porcentaje de aislados productores de enzimas de los grupos CTX-M-9, CTX-M-1 y SHV suficientes para su comparación con los aislados de alimentos.

En cuanto a los alimentos, también teniendo en cuenta el número de muestras en las que se aisló ECBLEE en el estudio anteriormente referido, decidimos incluir un mínimo de 15 muestras de cada producto cárnico; suponiendo que la frecuencia de colonización en huevos sería baja decidimos incluir un mínimo de 70 unidades, así como de 30 muestras de productos cocinados y ensaladas.

4.12 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa informático SPSS (versión 17.0; SPSS, Chicago, Illinois, United States). Las comparaciones de las proporciones se realizaron con el estadístico de contraste ji-cuadrado (chi-cuadrado) de Pearson (o prueba exacta de Fisher cuando fue necesario). Esta prueba se aplica con el fin de determinar si existe dependencia entre dos variables categóricas o bien para examinar la distribución que posee una variable categórica entre diferentes muestras.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Análisis de la prevalencia de ECBLEE

5.1.1 Muestras clínicas

En el periodo de estudio (septiembre de 2006-marzo de 2007) se aislaron en el laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen Macarena un total de 2606 aislados de *E. coli*, de los cuales 544 (20,9%) procedían de muestras de pacientes hospitalizados y 2062 (79,1%) de muestras de pacientes no hospitalizados. El número de aislados productores de BLEE fue 78 (3%). La mayoría de los aislados ECBLEE procedían de muestras de urocultivos (n=59; 76%) y hemocultivos (n=17; 22 %) (figura 2).

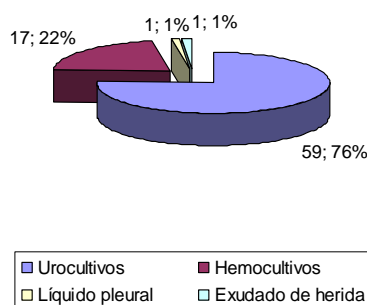


Figura 2. Distribución de aislados ECBLEE por tipo de muestra clínica

5.1.2 Muestras alimentarias

5.1.2.1 Colonización por coliformes

Se realizó recuento de coliformes en 94 (86%) muestras cárnicas crudas. En 41 muestras (44%) se encontró un alto recuento de coliformes ($\log > 3$ UFC/g) (Figura 3). Se compararon los resultados del grado de colonización por coliformes de estas muestras según el tipo de establecimiento donde se adquirieron (grandes superficies, supermercados y mercados), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($\log \leq 3$ vs $\log > 3$ UFC/g; $p=0,41$) (Tabla 18).

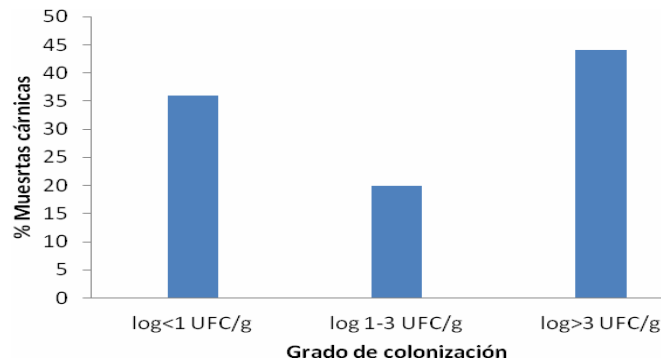


Figura 3. Distribución del grado de colonización de alimentos cárnicos crudos

Nº de muestras cárnicas colonizadas			
	log<1 UFC/g	log 1-3 UFC/g	log>3 UFC/g
Grandes superficies	12 (35,3)	4 (21,1)	18 (43,9)
Supermercados	12 (35,3)	7 (36,8)	9 (21,6)
Mercados	10 (29,4)	8 (42,1)	14 (34,5)
Total (N=94)	34 (36,2%)	19 (20,2%)	41(43,6%)

Tabla 18. Grado de colonización por coliformes de las muestras de origen cárnico en función del establecimiento de origen

Igualmente, se analizó si el origen aviar de las muestras estaba relacionado con un mayor grado de colonización por coliformes. Se encontró un porcentaje de muestras aviares con altos recuentos significativamente mayor que en el resto de muestras (59,3 % vs 37,3 %; $p=0,05$). Sin embargo, esta diferencia desaparece cuando se excluyen del análisis las muestras curadas (muestras de jamón y salchichón) (59,3% vs 64,9%); $p=0,64$).

Analizando por separado el recuento de coliformes en las muestras curadas, se obtuvo un recuento de coliformes log 1-3 UFC/g en 2 muestras de jamón y 2 de salchichón (13,3%) y un alto recuento (log>3 UFC/g) en una muestra de salchichón (6.7%). De las 30 muestras de alimentos cocinados, el 16,7 % de las muestras mostraron contaminación por coliformes. En 2 (6,7%) muestras el recuento fue superior a log 3 (Figura 4).

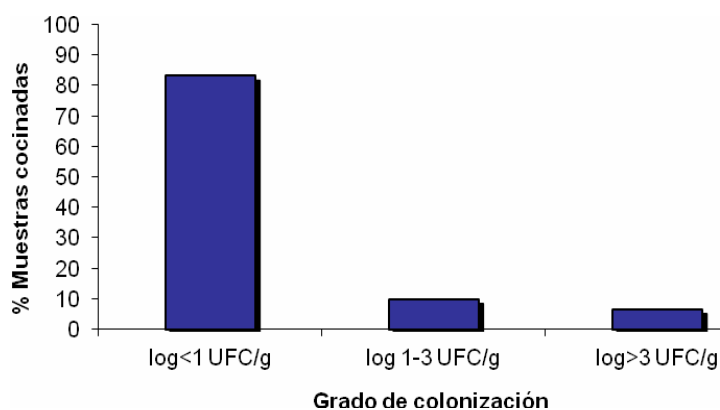


Figura 4. Distribución del grado de colonización de alimentos cárnicos cocinados

Entre las 32 muestras de vegetales crudos se aislaron coliformes en 10 (31%) de ellas. En 6 muestras se halló un recuento alto ($>\log 3$ UFC/g) de coliformes (Figura 5). En la siembra de las cáscaras de huevo procesadas no se aislaron coliformes.

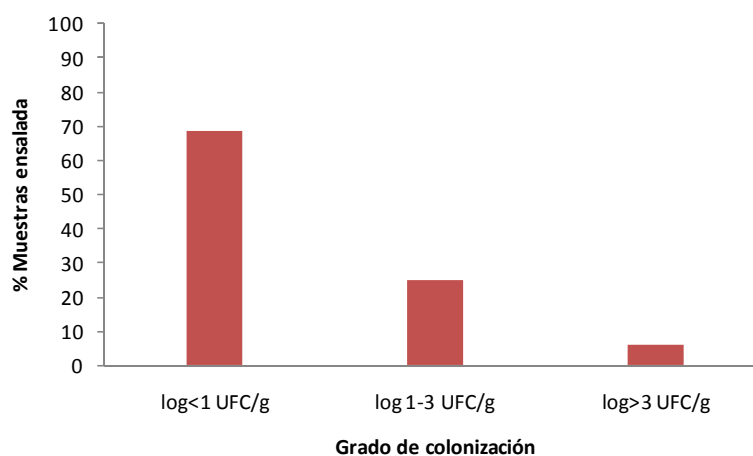


Figura 5. Frecuencia de colonización de vegetales crudos

5.1.2.2 ECBLEE

No se recuperó ningún aislado de ECBLEE en los alimentos para mascotas, alimentos cocinados ni en cáscaras de huevo. Se obtuvieron 81 aislados de ECBLEE en 31 (28,4%) de las 109 muestras de alimentos cárnicos crudos y en 1 (3,1%) de las 32 muestras de vegetales crudos. Puesto que la selección de aislados compatibles con *E. coli* de cada muestra se basó en criterios fenotípicos (selección por diferencias

en la morfología, tamaño y/o color), se realizó REP-PCR y se compararon entre si los perfiles de los aislados procedentes de la misma muestra, descartando aquellos procedentes del mismo clon. Se descartaron por este método 13 aislados, incluyendo finalmente 68 aislados de origen cárnico en el estudio.

En todos los tipos de muestras de origen cárnico crudas (ave, cerdo, ternera, jamón y embutido) se aisló ECBLEE, aunque con importantes diferencias en la frecuencia. El tipo de carne más frecuentemente colonizada fue la de origen aviar, que incluía carne procedente de pollo y pavo, con 23 (69,7%) de 33 muestras positivas (Figura 6). En carne de pollo se obtuvo al menos un aislado de ECBLEE en 15 (83%) de 18 muestras procesadas.

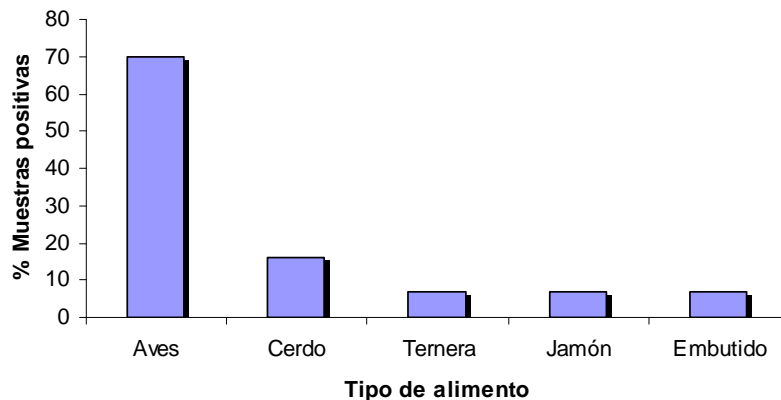


Figura 6. Prevalencia de ECBLEE en los distintos tipos de muestras cárnicas crudas estudiadas

Se determinó si la colonización por ECBLEE estaba relacionada con una mayor colonización por coliformes de los alimentos cárnicos. Se comparó para ello la frecuencia con la que se aisló ECBLEE en 2 grupos de muestras: a) aquellas en que el recuento de coliformes fue alto (>log3 UFC/g) y b) las que tuvieron un recuento log 1-3 UFC/g; no hallándose diferencias significativas (tabla 19).

Grado de colonización por coliformes	Nº muestras colonizadas por coliformes	Nº de muestras con ECBLEE (%)	Coliformes log >3 UFC/g vs log <3 UFC/g (p)
log 1-3 UFC/g	19	7 (36,8)	0,98
log >3 UFC/g	41	15 (36,6)	

Tabla 19. Porcentaje de muestras cárnicas crudas con ECBLEE en función del grado de colonización por coliformes. Realizado sobre 94 (86%) muestras cárnicas en las que se determinó el grado de colonización

Al comparar los porcentajes del número total de muestras cárnicas positivas con ECBLEE procedentes de los diferentes tipos de establecimiento, observamos una mayor frecuencia de muestras positivas en productos adquiridos en los establecimientos categorizados como "mercado" (n=37; 43,2%) que en los denominados "supermercado" (n=11; 28,2%) ($p=0,049$); las diferencias con las "grandes superficies" no fueron significativas (Figura 7).

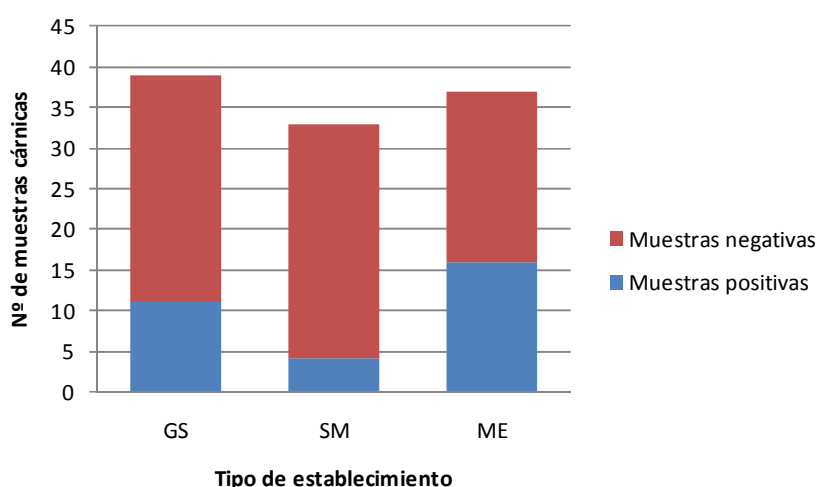


Figura 7. Distribución de muestras positivas y negativas para ECBLEE de origen alimentario adquiridas en grandes superficies (GS), supermercados (ME) y mercados (ME)

Analizando por separado los distintos tipos de productos cárnicos, esta mayor frecuencia de muestras positivas con ECBLEE procedentes de "mercados" frente a "supermercados" únicamente se observó en carne de ave (100% vs 30%; $p=0,001$). Como se muestra en la Tabla 20, también se encuentran más muestras positivas aviares en "grandes superficies" que en "supermercados", en el límite de la significancia estadística (75% vs 30%; $p=0,083$).

Entre los tipos de carne con un porcentaje inferior de muestras positivas para ECBLEE se encontraron la ternera y los productos cárnicos curados. Como se aprecia en la Tabla 20, todas las muestras positivas de estos tipos de carne provenían únicamente de establecimientos englobados en la categoría "mercado".

Tipo de muestra cárnica	Nº muestras positivas ECBLEE/total de muestras en cada tipo de establecimiento		
	GS	SM	ME
Ave	9/12	3/10	11/11
Cerdo	2/10	1/10	2/11
Ternera	0/5	0/5	1/5
Curada	0/12	0/8	2/10

Tabla 20. Frecuencia de muestras positivas en función del establecimiento de origen y tipo de animal. (GS: grandes superficies; SM: supermercado; ME: mercado).

Al comparar el porcentaje de muestras positivas para ECBLEE en carne de ave frente al del resto de productos cárnicos (englobados en una única categoría “no ave”), se aprecia una mayor frecuencia de ECBLEE en muestras aviares tanto en las adquiridas en “mercados” como en las provenientes de “grandes superficies”, y en el límite de la significación para “supermercados” (Tabla 21).

Tipo de establecimiento	Nº muestras positivas ECBLEE/total de muestras en cada tipo de establecimiento		p
	Tipo muestra cárnica		
	Ave (%)	No ave (%)	
GS	9/12 (75%)	2/27 (7,4%)	<0,001
SM	3/10 (30%)	1/23 (4,3%)	0,073
ME	11/11 (100%)	5/26 (19,2%)	<0,001

Tabla 21. Frecuencia de muestras positivas con ECBLEE de ave y otros productos cárnicos en función del establecimiento de origen. (GS: grandes superficies; SM: supermercado; ME: mercado)

5.2 Sensibilidad a antimicrobianos

5.2.1 Aislados de origen clínico

Los resultados de sensibilidad a antimicrobianos se muestran en la Tabla 22. Los aislados de origen clínico fueron todos sensibles a los carbapenémicos evaluados (imipenem y meropenem) y a la nitrofurantoína. En el caso de fosfomicina, tan sólo 1 aislado se mostró resistente a este antimicrobiano. Al comparar los resultados obtenidos con los aminoglucósidos, el porcentaje de aislados sensibles a amikacina y

gentamicina fue mayor que a tobramicina. Entre las combinaciones de betalactámico con inhibidor de betalactamasa, piperacilina-tazobactam fue ligeramente superior a amoxicilina-clavulánico. Los antimicrobianos menos activos fueron ácido nalidíxico, ciprofloxacino y cotrimoxazol.

Antimicrobiano		Sensible	Intermedio	Resistente
		N (%)	N (%)	N (%)
Penicilinas/ Inhibidor de	Betalactamasa			
	AMC	71 (91)	5 (6,4)	2 (2,6)
	TZP	74 (94,9)	3 (3,8)	1 (1,3)
	Cefalosporinas de 2ª G			
	FOX	69 (88,5)	6 (7,7)	3 (3,8)
	Quinolonas			
	NA	13 (16,7)	0	65 (83,3)
	CIP	15 (19,2)	2 (2,6)	61 (78,2)
	Aminoglucósidos			
	AK	74 (94,9)	0	4 (5,1)
	CN	72 (92,3)	0	6 (7,7)
	TOB	58 (74,4)	1 (1,3)	19 (24,3)
	Carbapenemas			
	IP	78 (100)	0	0
	MEM	78 (100)	0	0
	Otros			
	FOT	77 (98,7)	0	1 (1,3)
	NIT	78 (100)	0	0
	TSX	30 (38,5)	0	48 (61,5)

Tabla 22. Distribución de la sensibilidad a los antimicrobianos evaluados de aislados ECBLEE procedentes de muestras clínicas. AMC: amoxicilina / ácido clavulánico, AK: amikacina; CN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; FOT: fosfomicina, FOX: cefoxitina; IP: imipenem; MEM: meropenem; NA: ácido nalidíxico; NIT: nitrofurantoína; TZP: piperacilina / tazobactam; TOB: tobramicina; TSX: cotrimoxazol.

Se detectaron diferencias en los patrones de sensibilidad de los aislados de ECBLEE en función de los distintos grupos de enzimas producidas frente a tobramicina, ciprofloxacino y cotrimoxazol (Tabla 23). Los aislados de *E. coli* que producían BLEE del grupo CTX-M-1 eran con más frecuencia resistentes a la tobramicina que los que producían BLEE del grupo CTX-M-9 o SHV. Ciprofloxacino y cotrimoxazol mostraron en general escasa actividad sobre ECBLEE. Este hecho fue especialmente marcado en los aislados productores de BLEE del grupo CTX-M-1.

Antimicrobiano	Nº <i>E. coli</i> sensibles			Valor de p		
	CTX-M-1 (N=19)	CTX-M-9 (N=(29))	SHV (N=(30))	CTX-M-1 vs CTX-M-9	CTX-M-1 vs SHV	CTX-M-9 vs SHV
Tobramicina	4 (21,1%)	28 (96,6%)	26 (86,7%)	<0,0001	<0,0001	0,35
Ciprofloxacino	1 (5,3%)	10 (34,5%)	4 (13,3%)	0,03	0,63	0,05
Cotrimoxazol	4 (21,1%)	14 (48,3%)	12 (40%)	0,05	0,16	0,52

Tabla 23. Prevalencia de aislados *E. coli* de origen clínico sensibles a tobramicina, ciprofloxacino y cotrimoxazol en función del grupo de BLEE producida

Se observó resistencia a >1 familia de antibióticos en 50 aislados de origen clínico (64,1%). En la Tabla 24 se observa que el perfil de multiresistencia más frecuente fue el de resistencia a quinolonas y trimetoprim-sulfametoxazol (cotrimoxazol).

PERFIL DE RESISTENCIA		
Resistencia a familias de antibióticos	Nº aislados	(%)
1 familia		
NA	1	(1,3)
NA, CIP	15	19,2)
TOB	1	(1,3)
TSX	4	(4,9)
2 familias		
NA, CIP, AK, CN	1	(1,3)
NA, CIP, AK, TOB	1	(1,3)
NA, CIP, CN, TOB	2	(2,6)
NA, CIP, TSX	23	(29,5)
NA, TSX	3	(3,8)
FOT, TSX	1	(1,3)
FOX, NA, CIP	1	(1,3)
3 familias		
NA, CIP, CN, TSX	1	(1,3)
NA, CIP, TOB, TSX	11	(14,1)
NA, CIP, AK, TOB, TSX	1	(1,3)
NA, CIP, AK, CN, TOB, TSX	1	(1,3)
A/C, NA, CIP, TSX	1	(1,3)
FOX, NA, CIP, TSX	1	(1,3)
4 familias		
TZP, NA, CIP, TOB, TSX	1	(1,3)
AMC, FOX, NA, CIP, CN, TOB	1	(1,3)
Sensibles	7	(9)

Tabla 24. Perfiles de resistencia a antibióticos y frecuencia de aislados ECBLEE de origen clínico resistentes a 1 o más familias de antibióticos. AMC: amoxicilina / ácido clavulánico, AK: amikacina; CN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; FOT: fosfomicina, FOX: ceftoxitina; NA: ácido nalidíxico; TZP: piperacilina / tazobactam; TOB: tobramicina; TSX: cotrimoxazol.

En la Tabla 25 se muestra el número de aislados sensibles a los antimicrobianos en función del tipo de adquisición de la infección. No se encontraron diferencias significativas entre los 3 grupos.

	N° ECBLEE sensibles			
	Total (%)	Nosocomial (%)	Relación con la Asistencia sanitaria (%)	Comunitario Estricto (%)
ANTIMICROBIANO	N=78	N=22	N=18	N=38
Penicilinas				
/Inhibidor de Betalactamasa				
AMC	71 (91,0%)	20 (90,9%)	15 (83,3%)	36 (94,7%)
TZP	74 (94,9%)	21 (95,5%)	18 (100%)	35 (92,1%)
Cefalosporinas 2^ªG				
FOX	69 (88,5%)	16 (72,7%)	16 (88,9%)	37 (97,4%)
Quinolonas				
NA	13 (16,7%)	3 (13,6%)	1 (5,6%)	9 (23,7%)
CIP	15 (19,2%)	3 (13,6%)	2 (11,1%)	10 (26,3%)
Aminoglucósidos				
AK	74 (94,9%)	19 (86,4%)	17 (94,4%)	38 (100%)
CN	72 (92,3%)	19 (86,4%)	16 (88,9%)	37 (97,4%)
TOB	58 (74,4%)	13 (59,1%)	14 (77,8%)	31 (81,6%)
Carbapenemas				
IP	78 (100%)	22 (100%)	18 (100%)	38 (100%)
MEM	78 (100%)	22 (100%)	18 (100%)	38 (100%)
Otros				
FOT	77 (98,8%)	22 (100%)	18 (100%)	37 (97,4%)
NIT	78 (100%)	22 (100%)	18 (100%)	38 (100%)
TSX	30 (38,5%)	8 (36,4%)	7 (38,9%)	15 (39,5%)

Tabla 25. Sensibilidad a antimicrobianos en aislados clínicos de ECBLEE en función del origen de la infección (comunitaria, nosocomial y relacionada con la asistencia sanitaria). AMC: amoxicilina / ácido clavulánico, AK: amikacina; CN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; FOT: fosfomicina, FOX: cefoxitina; IP: imipenem; MEM: meropenem; NA: ácido nalidíxico; TZP: piperacilina / tazobactam; TOB: tobramicina; TSX: cotrimoxazol.

5.2.2 Aislados de origen alimentario

Los resultados del estudio de sensibilidad se muestran en la Tabla 26. De los antimicrobianos evaluados, piperacilina-tazobactam, amikacina, gentamicina, fosfomicina, cefoxitina y ertapenem fueron los que mayor actividad mostraron. Piperacilina-tazobactam mostró mayor actividad que amoxicilina-clavulánico (100% de sensibilidad frente a 92,6%). De los aislados sensibles a ciprofloxacina, 23 (62%) fueron resistentes al ácido nalidíxico.

Antimicrobiano	Sensible	Intermedio	Resistente
	N (%)	N (%)	N (%)
Penicilina/Inhibidor de Betalactamasa			
AMC	63 (92,6)	3 (4,4)	2 (3)
TZP	68 (100)	0	0
Cefalosporinas 2^a			
FOX	66 (97)	1 (1,5)	1 (1,5)
Quinolonas			
NA	14 (20,6)	0	54 (79,4)
CIP	37 (54,4)	5 (7,4)	26 (38,2)
Aminoglucósidos			
AK	68 (100)	0	0
CN	67 (98,5)	0	1 (1,5)
TOB	64 (94,1)	0	4 (5,9)
Carbapenemas			
ETP	66 (97)	2 (3)	0
Otros			
FOT	67 (98,5)	1 (1,5)	0

Tabla 26. Distribución de aislados de ECBLEE de origen alimentario sensibles (S), intermedios (I) y resistentes (R) a los antimicrobianos evaluados. AMC: amoxicilina / ácido clavulánico, AK: amikacina; CN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; ETP: ertapenem; FOT: fosfomicina, FOX: ceftioxitina; NA: ácido nalidíxico; TZP: piperacilina / tazobactam; TOB: tobramicina.

Se observó resistencia a >1 familia de antibióticos en 6 aislados de origen alimentario (8,8%). En la Tabla 27 se observa que el perfil de multirresistencia más frecuente fue el de resistencia a quinolonas y aminoglucósidos.

PERFIL DE RESISTENCIA		
Resistencia a familias de antibióticos	Nº de aislados	(%)
1 familia		
NA	28	(41,2)
NA, CIP	20	(29,4)
2 familias		
NA, CIP, CN	1	(1,5)
NA, CIP, TOB	1	(1,5)
NA, CIP, CN, TOB	2	(3)
3 familias		
AMC, FOX, NA, CIP	1	(1,5)
AMC, NA, CIP, TOB	1	(1,5)
Sensibles	14	(20,6)

Tabla 27. Perfiles de resistencia a antibióticos y frecuencia de aislados ECBLEE de origen cárnico resistentes a 1 o más familias de antibióticos. AMC: amoxicilina / ácido clavulánico; CN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; FOX: ceftioxima; NA: ácido nalidíxico; TOB: tobramicina

Al analizar los resultados de sensibilidad en función del tipo de BLEE, se encontraron diferencias únicamente en el caso de tobramicina, siendo los aislados productores de CTX-M-1 más resistentes a la misma que los productores de SHV (Tabla 28).

	Nº <i>E. coli</i> sensibles (%)			Valor de p		
	CTX-M-1 (N=5)	CTX-M-9 (N=9)	SHV N=(54)	CTX-M-1 vs CTX-M-9	CTX-M-1 vs SHV	CTX-M-9 vs SHV
Antimicrobiano						
Tobramicina	3 (60%)	8 (88,9%)	53 (98,1%)	0,51	0,02	0,27
Ciprofloxacino	1 (20%)	3 (33,3%)	33 (61,1%)	1	0,15	0,16

Tabla 28. Prevalencia de aislados *E. coli* de origen alimentario sensibles a tobramicina y ciprofloxacino en función del grupo de BLEE producida. Todas las comparaciones hechas con el Test de Fisher

5.2.3 Comparación entre aislados clínicos y alimentarios

Cuando se compararon los patrones de resistencia a los antimicrobianos presentados por aislados de origen clínico y de origen alimentario, se observaron diferencias significativas en el caso de ciprofloxacino ($p < 0,001$) y tobramicina

($p=0,001$), siendo significativamente mayor el porcentaje de aislados clínicos resistentes a ambos antimicrobianos ($p\leq 0,001$).

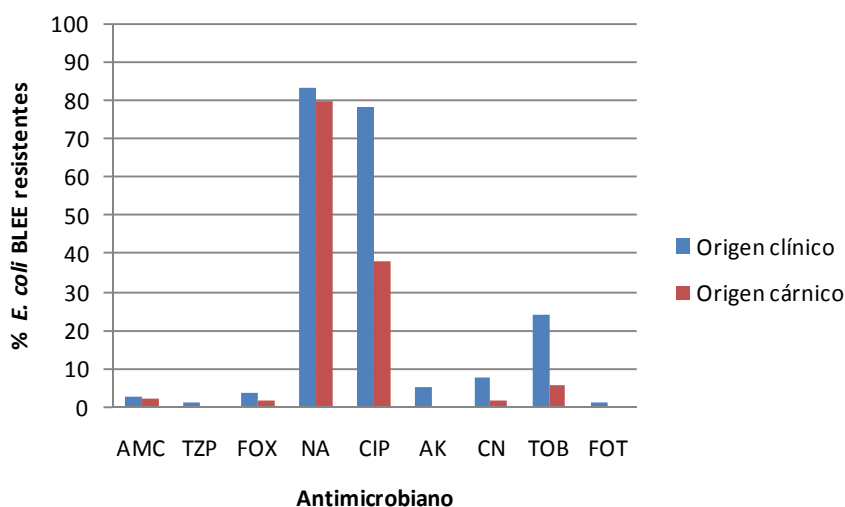


Figura 8. Distribución de aislados ECBLEE resistentes a los distintos antimicrobianos en función de su origen

5.3 Prevalencia de genes bla

5.3.1 Aislados de origen clínico

Como se observa en la Tabla 29, se observó una mayor frecuencia de aislados productores de enzimas del tipo CTX-M (61,5 %) que de enzimas del tipo SHV (38,5%) ($p=0,13$), aunque la enzima más prevalente fue SHV-12, seguida de CTX-M-14. Otras betalactamasas minoritarias halladas fueron CTX-M-9, CTX-M-1 y CTX-M-32.

Tipo de BEE	Nº de aislados (%)	
Grupo SHV		
SHV-12	30	(38,5)
Grupo CTX-M-9		
CTX-M-14	26	(33,3)
CTX-M-9	3	(3,8)
Grupo CTX-M-1		
CTX-M-15	17	(21,8)
CTX-M-1	1	(1,3)
CTX-M-32	1	(1,3)

Tabla 29. Frecuencias de BLEE detectadas en los aislados ECBLEE de origen clínico

Al comparar la distribución de BLEE producidas por aislados clínicos en función de la adquisición de la infección (nosocomial, comunitaria estricta y relacionada con la asistencia sanitaria), se observó que las enzimas del grupo CTX-M-1 eran producidas con mayor frecuencia por aislados de origen nosocomial que por aislados estrictamente comunitarios, siendo mayoritaria la betalactamasa CTX-M-15 (Tabla 30).

	Nº aislados ECBLEE (%)					
	NOS	RAS	CE	Valor de p		
	N=22	N=18	N=38	NOS vs. RAS	NOS vs. CE	RAS vs. CE
SHV	8 (36,4%)	6 (33,3%)	16 (42,1%)	0,84	0,66	0,53
SHV-12	8	6	16			
CTX-M-1	9 (40,9%)	4 (22,2%)	6 (15,8%)	0,21	0,03*	0,55
CTX-M-15	8	3	6			
CTX-M-1	0	1	0			
CTX-M-32	1	0	0			
CTX-M-9	5 (22,7%)	8 (44,4%)	16 (42,1%)	0,14	0,12	0,66
CTX-M-14	5	7	14			
CTX-M-9	0	1	2			

Tabla 30. Frecuencia de los distintos grupos de BLEE según el origen de la infección. NOS: nosocomial, RAS: relacionado con la atención sanitaria, CE: comunitario estricto. *Única comparación estadísticamente significativa

Como se observa en la Figura 9, la mayoría de aislados ECBLEE de adquisición nosocomial y relacionada con la asistencia sanitaria productores de enzimas grupo CTX-M-1 y todos los de origen comunitario, producían la betalactamasa CTX-M-15.

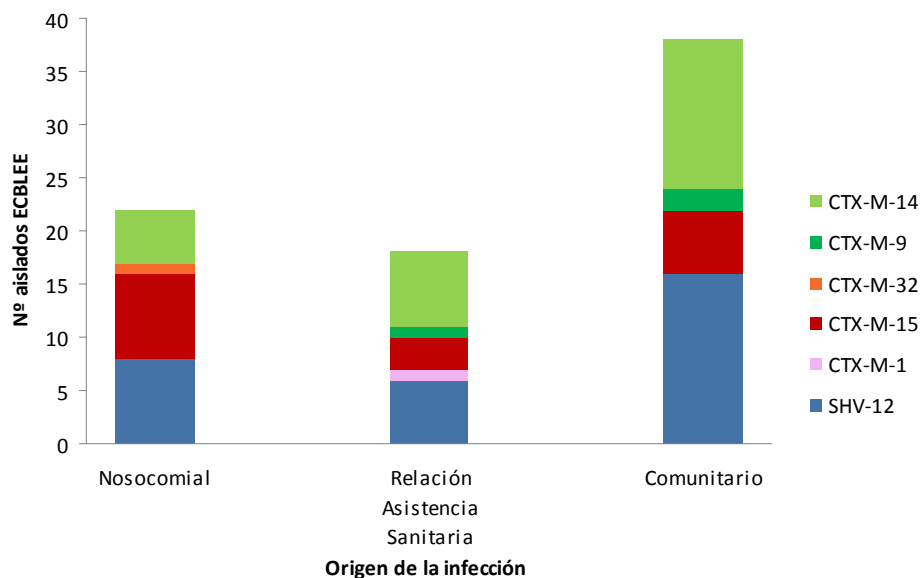


Figura 9. Prevalencia de genes *bla* en cepas de ECBLEE de origen clínico en función del origen de la infección

5.3.2 Aislados de origen alimentario

5.3.2.1 Origen cárnico

Como se observa en la Tabla 31, la frecuencia de aislados productores de enzimas del grupo SHV (79,4%) fue mayor que la de enzimas del tipo CTX-M (20,6%; $p < 0,001$). Dentro del tipo CTX-M, el grupo de enzimas más frecuentemente detectado fue CTX-M-9 (13,2 %). Dentro de este grupo de BLEE, el 100 % se caracterizaron como CTX-M-14. Los aislados productores de enzimas del grupo CTX-M-1 fueron los menos frecuentes (7,4 %). La BLEE más prevalente fue SHV-12, seguido por CTX-M-14.

Tipo de BEE	Nº de aislados (%)	
Grupo SHV		
SHV-12	54	(79,4)
Grupo CTX-M-9		
CTX-M-14	9	(13,2)
Grupo CTX-M-1		
CTX-M-15	3	(4,4)
CTX-M-1	1	(1,5)
CTX-M-32	1	(1,5)

Tabla 31. Frecuencia de BLEE en *E. coli* de origen cárnico

Se muestra en la Tabla 32 la distribución de los distintos grupos de enzimas en función de los tipos de muestras cárnicas en los que se aislaron los ECBLEE. En alimentos de origen aviar, se observó una mayor frecuencia de enzimas SHV-12 ($p=0,22$) sin significación estadística.

Grupo de BLEE	Nº de aislados positivos con ECBLEE (%)			
	Ave (N=57)	Cerdo (N=6)	Ternera (N=2)	Embutido (N=3)
SHV (N=54)	47 (82,4)	4 (66,7)	2 (100)	1 (33,3)
CTX-M-9 (N=9)	5 (8,8)	2 (33,3)	0	2 (66,6)
CTX-M-1 (N=5)	5 (8,8)	0	0	0
N Total=68	57	6	2	3

Tabla 32. Frecuencia de cada tipo de BLEE en cepas de *E. coli* procedentes de muestras cárnicas crudas. Porcentajes calculados respecto al número de ECBLEE aislados de cada tipo de carne

No se encontraron diferencias significativas en el tipo de BLEE expresada por *E. coli* en función del tipo de establecimiento en el que se adquirió la muestra de la cual se aisló ($p=0,66$), siendo en todos más frecuente el aislamiento de *E. coli* productor de SHV (tabla 33).

N° de ECBLEE por tipo de establecimiento (%)

Grupo de BLEE	Gran Superficie	Supermercado	Mercado
SHV	16 (84,2)	8 (88,8)	30 (75)
CTX-M-1	1 (5,3)	1 (11,2)	3 (7,5)
CTX-M-9	2 (11,5)	0	7 (17,5)

Tabla 33. Distribución de BLEE en *E. coli* de origen alimentario en función del tipo de establecimiento de origen de la muestra cárnica

5.3.2.2 Otros alimentos

Como se comentó anteriormente, en el resto de muestras de alimentos solamente se aisló 1 (3,1%) ECBLEE en una muestra de ensalada. La enzima que expresaba fue caracterizada como SHV-12.

5.3.3 Comparación entre aislados clínicos y alimentarios

Se encontraron diferencias significativas cuando se comparó la distribución de los 3 grupos de BLEE en *E. coli* de origen clínico y *E. coli* de origen alimentario. Como se aprecia en la Figura 10, en *E. coli* de origen alimentario era más frecuente la producción de betalactamasas del grupo SHV que en aislados de origen clínico (79,4% vs 38,5%; $p < 0,0001$). En estos últimos, era más frecuente la producción de enzimas de los grupos CTX-M, tanto CTX-M-1 (24,4% vs 7,4%; $p = 0,005$) como CTX-M-9 (37,2% vs 13,2%; $p = 0,001$).

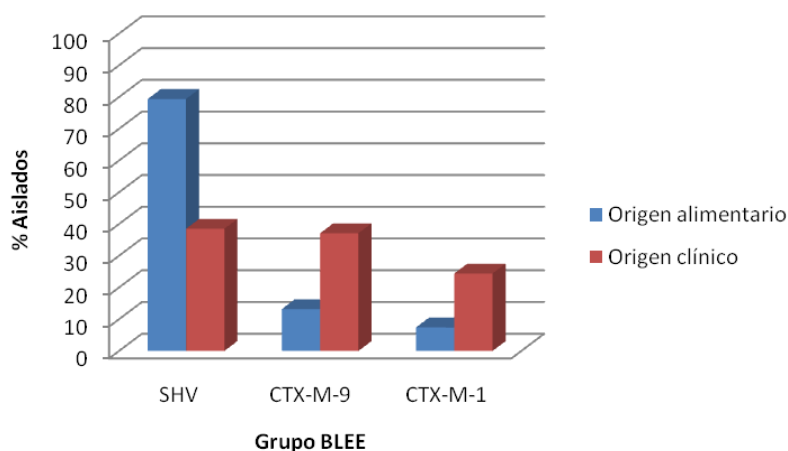


Figura 10. Grupos de BLEE producidas por aislados de *E. coli* de origen clínico y alimentario

5.4 Prevalencia de Filogrupos

5.4.1 Aislados de origen clínico

En ECBLEE de origen clínico el filogrupo mayoritario fue el B1, seguido por el B2₃, A1, D y A0 (Figura 11).

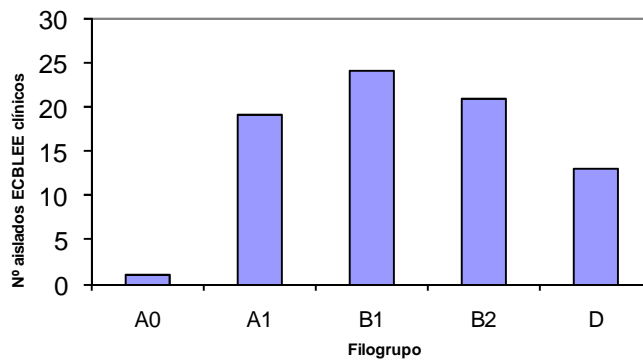


Figura 11. Distribución de filogrupos en los aislados ECBLEE de origen clínico

5.4.2 Aislados de origen alimentario

El grupo filogenético predominante en aislados de origen alimentario fue el A1, seguido del B1, D y por último el B2₃ y A0 (Figura 12).

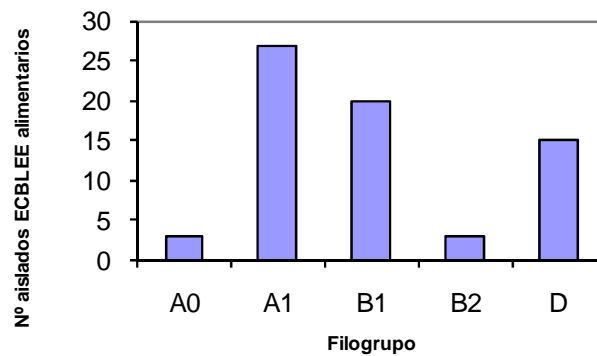


Figura 12. Distribución de filogrupos en los aislados ECBLEE de origen alimentario

5.4.3 Comparación entre aislados clínicos y alimentarios

La frecuencia de filogrupos en aislados clínicos y de origen alimentario fue diferente. Los aislados pertenecientes al filogrupo B2₃ eran mayoritariamente procedentes de muestras clínicas (Tabla 34). Los aislados pertenecientes al filogrupo A1 procedían con mayor frecuencia de muestras alimentarias. La única cepa aislada en una muestra de vegetales crudos fue asignada al grupo filogenético B1.

N ^a aislados positivos ECBLEE (%)					
Filogrupo	Alimentario		Clínico		p
A0	3	(4,1)	1	(1,2)	0,33
A1	27	(39,7)	19	(24,4)	0,046
B1	20	(29,4)	24	(30,8)	0,85
B2₃	3	(4,4)	21	(26,9)	0,003
D	15	(22)	13	(16,7)	0,41

Tabla 34. Distribución de filogrupos en aislados clínicos y de origen alimentario (p=0,001). NT: no tipable. No se incluye la cepa ECBLEE aislada de vegetales crudos

5.4.4 Comparación entre tipos de BLEE

Se observaron diferencias en la distribución de los filogrupos según el tipo de BLEE que producían los aislados clínicos y de alimentos considerados conjuntamente (tabla 35). Los aislados de *E. coli* productores de SHV pertenecían con más frecuencia al filogrupo A que los aislados productores de enzimas del grupo CTX-M. Los aislados productores de BLEE del grupo CTX-M-9 pertenecían con más frecuencia al filogrupo B1 que los que producían CTX-M del grupo 1 o SHV. Por último, los aislados que producían enzimas del grupo CTX-M-1 pertenecían al filogrupo B2₃ con más frecuencia que el resto de aislados.

FG	N ^o ECBLEE positivos (%)						Valor de p		
	SHV N=84	CTX-M-1 N=24	CTX-M-9 N=38	SHV vs CTX-M-1	SHV vs CTX-M-9	CTX-M-1 vs CTX-M-9			
A1	40	(47,6)	6	(25)	4	(10,5)	0,048	<0,001	0,16
B1	22	(26,2)	2	(8,3)	20	(52,6)	0,09	0,004	<0,001
B2₃	3	(3,6)	15	(62,5)	6	(15,8)	<0,001	0,025	<0,001
D	19	(22,6)	1	(4,2)	8	(21,1)	0,04	0,085	0,13

Tabla 35. Distribución de los filogrupos según el tipo de BLEE en el total de aislados ECBLEE (origen clínico y alimentario). Los porcentajes se calcularon respecto al número total de aislados productores de cada grupo de BLEE. FG: filogrupo

Como se ha comentado, la distribución de filogrupos era diferente entre aislados clínicos y de origen alimentario. En la Tabla 36, se analiza de nuevo la frecuencia de filogrupos en los dos conjuntos de aislados, agrupándolos por el tipo de BLEE producida. Los aislados del filogrupo B2₃ eran mayoritariamente de origen clínico, como se vio en la comparación anterior, y además estos aislados producían mayoritariamente enzimas del grupo CTX-M-1.

Grupo BLEE	Filogrupo	ORIGEN		p
		Alimentario N (%)	Clínico N (%)	
SHV	A0	3 (5,6)	1 (3,3)	1,00
	A1	25 (46,3)	11 (36,7)	0,39
	B1	12 (22,2)	10 (33,3)	0,26
	B2 ₃	2 (3,7)	1 (3,3)	1,00
	D	12 (22,2)	7 (23,3)	0,90
CTX-M-1	A0	0	0	
	A1	2 (40)	4 (21)	0,56
	B1	2 (40)	0	0,066
	B2 ₃	1 (20)	14 (73,7)	0,047
	D	0	1 (5,3)	1,00
CTX-M-9	A0	0	0	
	A1	0	4 (13,8)	0,55
	B1	6 (66,7)	14 (48,3)	0,34
	B2 ₃	0	6 (20,7)	0,33
	D	3 (33,3)	5 (17,2)	0,57

Tabla 36. Distribución de filogrupos en aislados de origen alimentario y clínico según el tipo de BLEE producida. Los porcentajes se calcularon respecto al total de aislados de cada origen productores de un grupo de BLEE

5.5 Serogrupo y factores de virulencia (FV)

El estudio de FV se llevó a cabo en una selección de aislados ECBLEE productores de CTX-M-15 (17 aislados de origen clínico y 3 de origen alimentario) y SHV-12 (30 aislados de origen clínico y 54 de origen alimentario). El estudio de los resultados se realizó de forma conjunta y comparativa con los aislados de origen clínico y alimentario.

5.5.1 Análisis de FV

Como se observa en la Tabla 37, los aislados de origen clínico poseían más genes codificantes de FV que los aislados de origen alimentario y estos eran más variados. El gen que más frecuentemente se detectó en el conjunto de todos los aislados fue *fimH* (que codifica para una adhesina habitual en *E. coli*), seguido de *iucD*. Los genes *afa/draBC* ($p=0,001$) *neuC*, *ibeA* y *papC* fueron detectados solamente en ECBLEE de origen clínico.

Genes de virulencia	Nº ECBLEE positivos (%)				
	Aislados de origen clínico (N= 47)		Aislados de origen alimentario (N= 57)		
Adhesinas					
<i>afa/draBC</i>	11	(23,4)	0		0,001
<i>papC</i>	2	(4,3)	0		
<i>fimH</i>	45	(95,7)	55	(96,5)	
<i>sfa/focDE</i>	0	0	0		
Sideróforos					
<i>iucD</i>	29	(61,7)	27	(47,4)	0,14
Protectinas/ invasinas					
<i>K1(neuC)</i>	1	(2,1)	0		
<i>ibeA</i>	3	(6,3)	0		0,089
Toxinas					
<i>tsh</i>	4	(8,5)	11	(19,3)	0,12
<i>hlyA</i>	0	0	0		
<i>cnf1</i>	0	0	0		

Tabla 37. Prevalencia de genes de virulencia en ECBLEE en función de su origen clínico o alimentario

Cuando se estratificaron los aislados por filogrupos, se observó que las diferencias en cuanto a la frecuencia de FV en aislados clínicos y alimentario sólo eran significativas dentro del filogrupo B1, donde los aislados de origen clínico poseían con más frecuencia 2 o más FV que los de origen alimentario. Hay que señalar que también se obtuvo un número alto de aislados clínicos con 2 o más FV en el filogrupo B2₃, aunque la representación de aislados de origen alimentario en este

Resultados

filogrupo es muy escasa y los resultados de la comparación no fueron estadísticamente significativos (Tabla 38).

Nº de FV	Nº de aislados		≥2FV p*
	Origen clínico (n=47)	Origen alimentario (n=57)	
Filogrupos A0/A1 (n=46)	n=16	n=30	
0	0	0	0,56
1	5	12	
2	4	13	
3	6	5	
4	1	0	
Filogrupo B1(n=13)	n=10	n=13	
0	0	7	<0,001
1	2	6	
2	5	0	
3	2	0	
4	1	0	
Filogrupo B2 ₃ (n=16)	n=14	n=2	
0	1	0	0,24
1	0	1	
2	2	0	
3	11	0	
4	0	1	
Filogrupo D (n=19)	n=7	n=12	
0	0	0	1
1	0	1	
2	0	1	
3	1	7	
4	6	3	
Todos los aislados (N=104)			
0	1	7	0,001
1	7	20	
2	11	14	
3	20	12	
4	8	4	

Tabla 38. Prevalencia de genes de virulencia en ECBLEE de los diferentes filogrupos en función de su origen clínico o alimentario

Analizando los resultados en función de la BLEE producida por los aislados, se observa, por una parte, que todos los aislados de origen clínico que poseían el gen *afa/draBC* eran productores de CTX-M-15, y por otra, que el gen *iucD* era más

prevalente en los aislados productores de esta misma BLEE. El gen *afa/draBC* no fue detectado en aislados alimentarios o productores de SHV-12. Además, como se aprecia en la Tabla 39, los aislados productores de SHV-12 fueron los únicos en los que se detectaron los genes *neuC*, *ibeA*, *tsh* y *papC*.

Gen de virulencia	N° ECBLEE positivos (%)		P
	Productores de SHV-12 (N=84)	Productores de CTX-M-15 (N=20)	
Adhesinas			
<i>afa/draBC</i>	0	11 (55)	0,0001
<i>papC</i>	2 (2,4)	0	
<i>fimH</i>	81 (96,4)	19 (95)	
<i>sfa/focDE</i>	0	0	
Sideróforos			
<i>iucD</i>	39 (46,4)	17 (85)	0,002
Protectinas /invasinas			
<i>K1(neuC)</i>	1 (1,2)	0	
<i>ibeA</i>	3 (3,6)	0	
Toxinas			
<i>tsh</i>	15 (17,8)	0	0,07
<i>hly</i>	0	0	
<i>cnf1</i>	0	0	

Tabla 39. Prevalencia de genes de virulencia en *E. coli* en función del tipo de BLEE producida

Entre los aislados productores de SHV-12, sólo 4 pudieron clasificarse como ExPEC y todos procedían de infecciones urinarias, 3 casos de origen comunitario y uno de origen nosocomial. Entre los genes codificantes de factores de virulencia determinantes del patotipo ExPEC (*afa/fraBC*, *sfa/focDE*, *iucD*, *ibeA* y *papC*) el gen *iucD* fue el que se presentó con más frecuencia, en 39 de 84 aislados (45%).

N° cepa	Origen	FG	BLEE	Factor de virulencia			
				<i>iucD</i> (<i>aer</i>)	<i>neuC</i> (K1)	<i>ibeA</i>	<i>papC</i>
47	Clínico	A	SHV-12	+	+	-	+
52	Clínico	D	SHV-12	+	-	-	+
282	Clínico	D	SHV-12	+	-	+	-
372	Clínico	D	SHV-12	+	-	+	-

Tabla 40. Características de las cepas de *E. coli* productoras de SHV-12 clasificadas como ExPEC. NT: no tipable; FG: filogrupo

Entre los aislados productores de CTX-M-15, 11 se clasificaron como ExPEC (8 de casos de ITU y 3 de hemocultivos). En todos se amplificaron los genes de virulencia *afa/dra*, *iucD*, y *fimH*.

En el grupo de aislados productores de SHV-12 (30 de 47 aislados clínicos y 54 de 57 aislados de origen cárnico), se determinó la frecuencia de 3 genes de virulencia adicionales (Tabla 41)

No se encontraron diferencias en la frecuencia de estos genes de virulencia en los aislados productores de SHV-12 en función de su origen clínico o alimentario.

Genes de virulencia	Total	Origen alimentario	Origen clínico	P
		(%) N=30	(%) N=54	
Adhesinas				
<i>fim78</i>	16	5 (16,7)	11 (20,4)	0,67
Toxinas				
<i>cdt</i>	1	0	1 (1,9)	1
Colicina V				
<i>cvaC</i>	33	15 (50)	18 (33,3)	0,13

Tabla 41. Frecuencia de los genes de virulencia *fimH*, *cdt* y *cvaC* en *E. coli* productor de SHV-12 en función de su origen

Se analizó la frecuencia con la que los aislados de diferentes filogrupos poseían los diferentes genes codificantes de FV, observándose diferencias significativas en algunos casos (Figura 13). En el grupo de aislados pertenecientes al filogrupo B2₃ fueron más frecuentes los genes *iucD* (valor de p filogrupo B2₃ vs. NO B2₃=0,027) y *afa/draBC* (valor de p filogrupo B2₃ vs. filogrupo No B2₃=0,001) que en el resto de

aislados. En el filogrupo D fueron más frecuentes los genes *iucD* (valor de p filogrupo D vs. filogrupo no D=0,02) y *tsh* (valor de p filogrupo D vs. filogrupo no D=0,006) (Figura 13). Al comparar la frecuencia del gen *iucD* entre aislados del filogrupo B2₃ y D no se observaron diferencias (p=0,95). La presencia del gen *ibeA* fue más frecuente en *E. coli* perteneciente al filogrupo D, pero sin significación estadística (p=0,08). Este gen no se detectó en *E. coli* de los filogrupos A o B1.

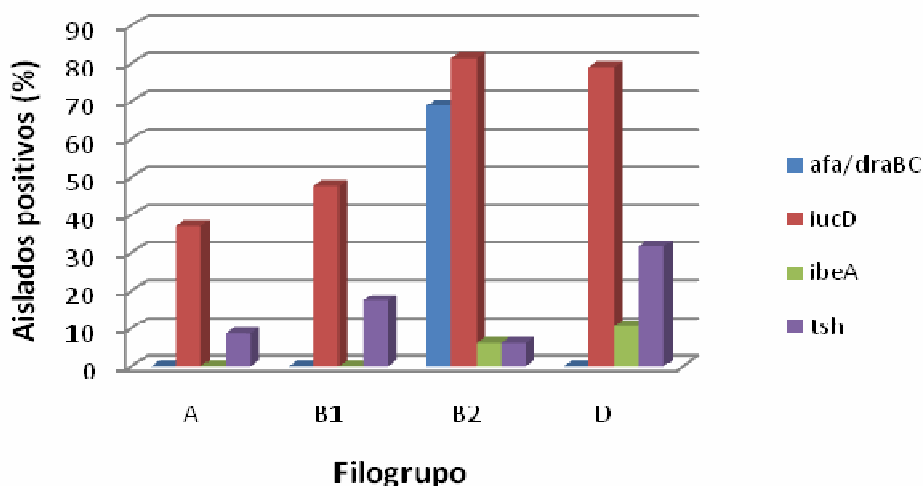


Figura 13. Distribución de los FV *afa/draBC*, *iucD*, *ibeA* y *tsh* en *E. coli* en función del filogrupo

Al analizar la frecuencia de los FV en función de la resistencia de los aislados al ácido nalidíxico no se observaron diferencias significativas entre aislados resistentes y sensibles al antimicrobiano (Tabla 42). Cuando se realizó el mismo análisis en función de la resistencia a ciprofloxacino, se observó que era más frecuente que los aislados resistentes a este antimicrobiano tuvieran 2 o más FV (p=0,04), aunque esta diferencia no pudo asignarse a ningún grupo filogenético en concreto (Tabla 43).

Nº de FV	Nº de aislados		≥2FV p*
	Ácido Nalidixico resistentes (n=86)	Ácido Nalidixico sensibles (n=18)	
Filogrupos A0/A1/B1 (n=69)			
0	0	0	0,97
1	17	4	
2	26	3	
3	10	6	
4	3	0	
Filogrupo D (n=19)			
0	0	0	1
1	1	0	
2	5	0	
3	5	3	
4	5	0	
Filogrupo B2 ₃ (n=16)			
0	1	0	1
1	1	0	
2	1	1	
3	11	0	
4	0	1	
Todos los aislados (n=104)			
0	1	0	0,92
1	19	4	
2	32	4	
3	26	9	
4	8	1	

Tabla 42. Comparación del número de FV presentes en *E. coli* en función de la sensibilidad al ácido nalidíxico. *Se compararon los porcentajes de aislados con 2 o más FV

N° de FV	N° de aislados		≥2FV p*
	Ciprofloxacino resistentes (n=62)	Ciprofloxacino sensibles (n=42)	
Filogrupos A0/A1/B1 (n=69)			
0	0	0	0,23
1	9	12	
2	18	11	
3	8	8	
4	2	1	
Filogrupo D (n=19)			
0	0	0	0,37
1	0	1	
2	5	0	
3	2	6	
4	5	0	
Filogrupo B2 ₃ (n=16)			
0	1	0	0,35
1	0	1	
2	1	1	
3	11	0	
4	0	1	
Todos los aislados (N=104)			
0	1	0	0,041
1	9	14	
2	24	12	
3	21	14	
4	7	2	

Tabla 43. Comparación del número de FV presentes en *E. coli* en función de la sensibilidad a ciprofloxacino. *Se compararon los porcentajes de aislados con 2 o más FV

Cuando se repitieron los análisis anteriores considerando únicamente los FV que con más frecuencia se han asociado al estatus ExPEC (*afa/draBC*, *iucD*, *sfa/focDE* y *papC*) se encontró que el conjunto de aislados resistentes al ácido nalidíxico mostraba una tendencia no estadísticamente significativa a tener 2 o más FV con más frecuencia que los aislados sensibles ($p=0,067$). La mayoría de estos aislados con 2 o más FV pertenecían al filogrupo B2₃, aunque en el análisis por filogrupos no

se observaron diferencias estadísticamente significativas, probablemente debido al bajo número de aislados sensibles al antimicrobiano (Tabla 44).

Nº de FV ExPEC	Nº de aislados		>=2FV p*
	Ácido Nalidixico resistentes (n=86)	Ácido Nalidixico sensibles (n=18)	
Filogrupos A0/A1/B1 (n=69)			
0	36	6	
1	19	7	
2	1	0	1
3	0	0	
4	0	0	
Filogrupo D (n=19)			
0	4	0	1
1	9	3	
2	2	0	
3	1	0	
4	0	0	
Filogrupo B2 ₃ (n=16)			
0	2	0	0,2
1	1	2	
2	11	0	
3	0	0	
4	0	0	
Todos los aislados			
0	42	6	0,067
1	29	12	
2	14	0	
3	1	0	
4	0	0	

Tabla 44. Comparación del número de FV determinantes del estatus ExPEC presentes en *E. coli* en función de la sensibilidad al ácido nalidixico. *Se compararon los porcentajes de aislados ECBLEE con 2 o más FV

En el caso de ciprofloxacino, los aislados resistentes a este antibiótico tenían con más frecuencia que los sensibles 2 o más FV asociados al estatus ExPEC

($p=0,004$). Como se observa en la Tabla 45, cuando se realizó el análisis por filogrupos, esta diferencia se encontró sólo en los aislados del filogrupo B2₃ ($p=0,02$).

Nº de FV ExPEC	Nº de aislados		≥2FV p*
	Ciprofloxacino resistentes (n=62)	Ciprofloxacino sensibles (n=42)	
Filogrupos A0/A1/B1 (n=69)			
0	21	21	1
1	16	10	
2	0	1	
3	0	0	
4	0	0	
Filogrupo D (n=19)			
0	3	1	0,26
1	6	6	
2	2	0	
3	1	0	
4	0	0	
Filogrupo B2 ₃ (n=16)			
0	1	1	0,02
1	1	2	
2	11	0	
3	0	0	
4	0	0	
Todos los aislados (n=104)			
0	25	23	0,004
1	23	18	
2	13	1	
3	1	0	
4	0	0	

Tabla 45. Comparación del número de FV determinantes del estatus ExPEC presentes en *E. coli* en función de la sensibilidad al ciprofloxacino. *Se compararon los porcentajes de aislados ECBLEE con 2 o más FV

5.5.2 Análisis de serogrupos

En el total de aislados estudiados, los no tipables constituyeron el grupo más prevalente, seguido de los pertenecientes a los serogrupos O25, O15 y O8 (Figura 14).

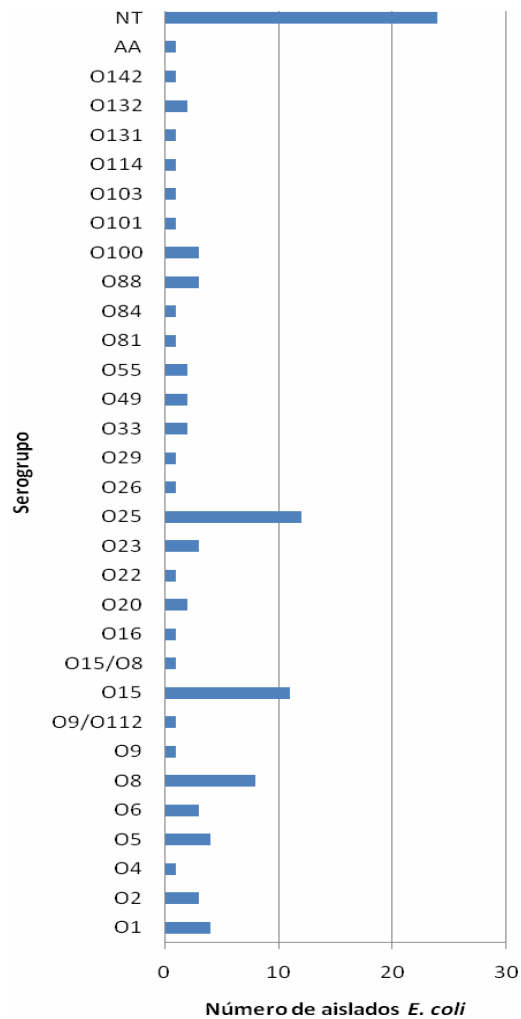


Figura 14. Distribución de serogrupos en aislados de *E. coli* productores de SHV-12 y CTX-M-15. NT: no tipable; AA: autoaglutinante

5.5.2.1 *E. coli* productor de CTX-M-15

Las cepas productoras de CTX-M-15 se agruparon en 4 serogrupos (Figura 15). El más prevalente fue el serogrupo O25b, integrado por 12 aislados de origen clínico (70,6% de los productores de CTX-M-15 de origen clínico), seguido del O55 con 2 aislados de origen alimentario, O8 con un aislado y O20 con otro, de orígenes

clínico y alimentario respectivamente. Los 4 aislados restantes resultaron no tipables por los métodos serológicos utilizados. Como se comentó anteriormente, del total de 12 aislados pertenecientes al serogrupo O25b, 11 fueron caracterizados como ExPEC, tras conseguir amplificación de los genes de virulencia *afa/draBC* e *iucD*.

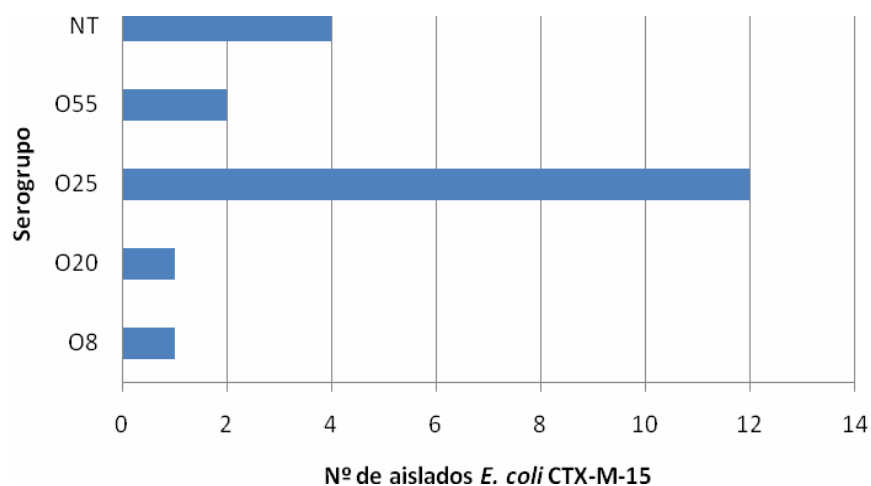


Figura 15. Distribución de serogrupos en *E. coli* productor de CTX-M-15. NT: no tipable

5. 7. 2. 2 *E. coli* productor de SHV-12

Como se observa en la Figura 16, los 84 aislados productores de SHV-12 se agruparon en 29 serogrupos. Los más frecuentes fueron O15 y O8, con 12 y 7 aislados respectivamente. Los serogrupos O1 y O5 les siguieron en frecuencia con 4 aislados cada uno. El 24% de los aislados no reaccionó con ninguno de los antisueros preparados, por lo que se clasificaron como no tipables. Un aislado se caracterizó como autoaglutinante.

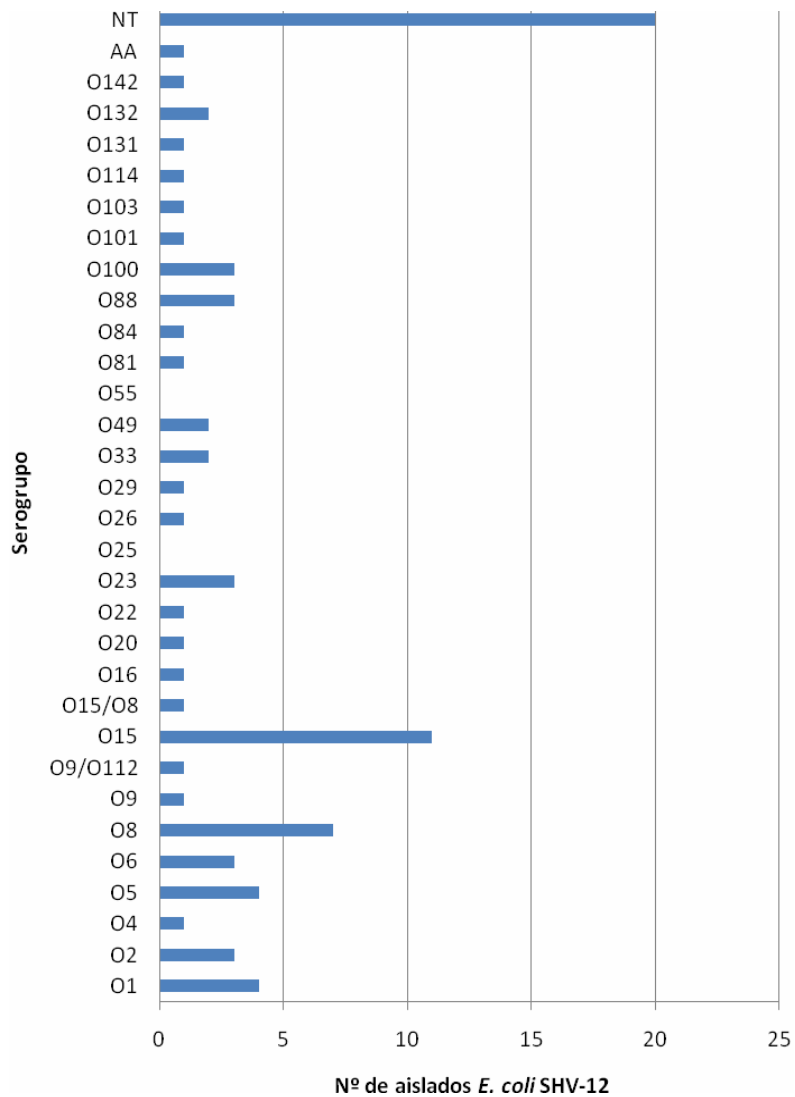


Figura 16. Distribución de serogrupos en *E. coli* productor de SHV-12. NT: no tipable; AA: autoaglutinante

5. 5. 2. 3 Comparación entre aislados clínicos y alimentarios

Al comparar los serogrupos según el origen clínico o alimentario de los aislados ECBLEE, se observó que el serogrupo O25, como se ha mencionado anteriormente, sólo se encontró en aislados clínicos ($p \leq 0,0001$). En el grupo de *E. coli* de origen alimentario se observa una mayor frecuencia de aislados pertenecientes al serogrupo O15 que en los que procedían de muestras clínicas ($p = 0,057$).

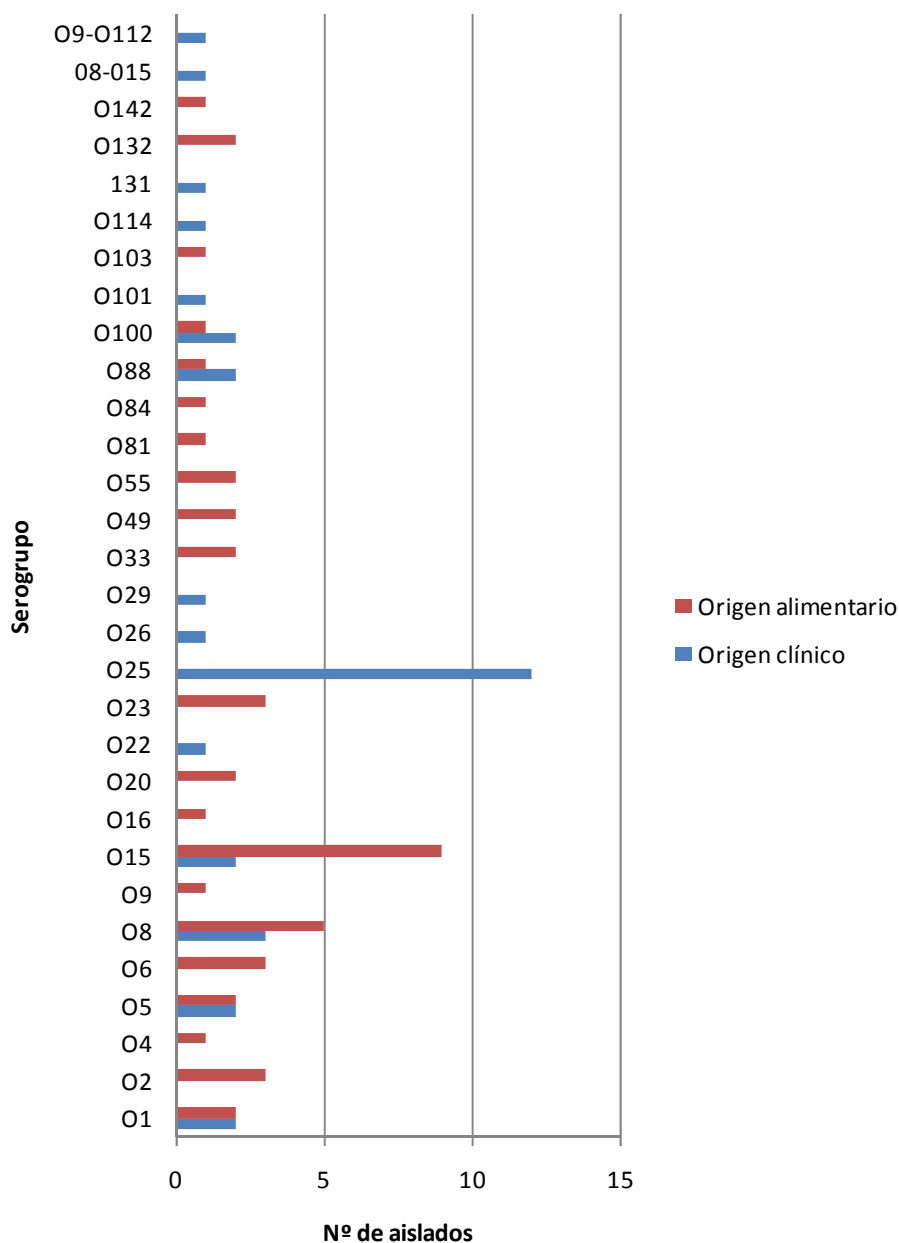


Figura 17. Comparación de la distribución de serogrupos según el origen de los aislados ECBLEE

Dentro del grupo de ECBLEE de origen alimentario, no se observaron diferencias significativas en la distribución de serotipos entre los que procedían de muestras de carne de ave y los que se aislaron de otro tipo de muestras ($p=0,125$).

Los aislados de ECBLEE con los serogrupos más prevalentes se distribuían en los siguientes filogrupos:

- Serogrupo O25: 12 aislados de origen clínico pertenecientes al filogrupo B2₃.
- Serogrupo O15: 12 aislados, 9 de ellos de origen alimentario de los filogrupos A1 (5), B1 (2) y D (2) y 3 de origen clínico de los filogrupos A1, B1 y D. El aislado del filogrupo A1 aglutinó también con el antisuero O8.
- Serogrupo O8: 8 aislados, 5 de ellos de origen alimentario de los filogrupos A0 (1), A1 (2) y B1 (2) y 3 aislados clínicos de los filogrupos A1 (2) y B2₃ (1).

5.6 Estudio de clonalidad

En el total de aislados estudiados (N=146) se encontraron 131 pulsotipos diferentes. Se observaron grupos clonales entre aislados productores tanto en productores de SHV-12, como en productores de CTX-M.

5.6.1 Estudio de clonalidad de *E. coli* productor de SHV-12

Se analizaron un total de 84 aislados ECBLEE productores de SHV-12:

- 54 (79,4%) aislados procedentes de muestras de alimentos cárnicos crudos.
- 30 (38,5%) aislados procedentes de muestras clínicas.

Los aislados se agruparon en 81 pulsotipos, observándose 3 grupos clonales (>1 aislado) con un porcentaje de similitud mayor de 85%. Todos los aislados incluidos en estos 3 grupos clonales pertenecían al filogrupo A1:

1. Dos aislados, uno clínico (nº 362), procedente de un paciente con ITU de origen comunitario y uno procedente de una muestra de carne de pollo (nº 94/7), mostraron un porcentaje de similitud del 95% (Figura 18) y el mismo perfil de genes de virulencia (*fimH*, *tsh* *iucD*), serogrupo (O8) y filogrupo (A).
2. Dos aislados de origen alimentario (nº aislado 111/2, procedente de una muestra de carne de cerdo; nº aislado 112/3, procedente de una muestra de carne de ternera) con una similitud del 100% y pertenecientes al filogrupo A1 (Figura 19). Ambos mostraron resistencia al ácido nalidíxico y sensibilidad al ciprofloxacino y poseían únicamente el gen de virulencia *fimH*. Las muestras

de origen se adquirieron en la misma fecha en el mismo establecimiento (mercado).

3. Dos aislados de origen clínico procedentes de muestras de orina. Uno procedente de un paciente con ITU de origen comunitaria (nº aislado 30) y otro de un paciente con ITU de adquisición nosocomial (nº aislado 343). Los dos aislados mostraron resistencia a fluorquinolonas, pertenecían al filogrupo A1 y poseían un sólo gen de virulencia, *fimH* (Figura 19).

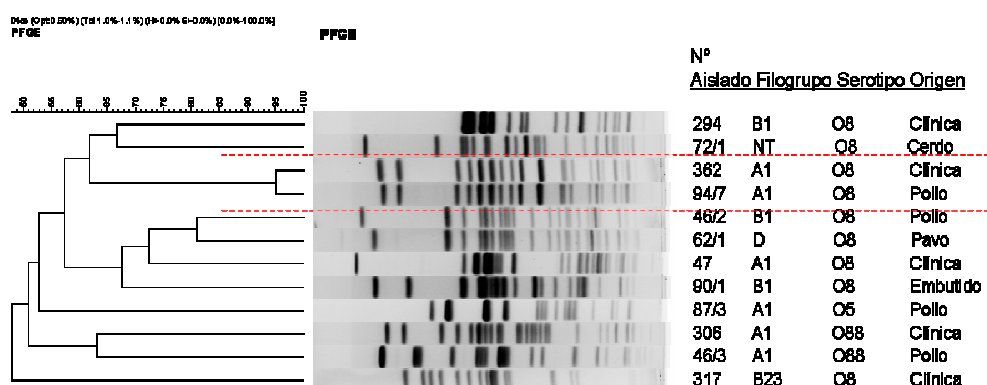


Figura 18. Dendrograma obtenido mediante PFGE con *Xba*I de aislados productores de SHV-12. Entre líneas se muestra la relación clonal entre un aislado de *E. coli* de origen clínico (nº aislado 362) y otro de origen alimentario (nº aislado 94/7) productores ambos SHV-12 y pertenecientes al filogrupo A1

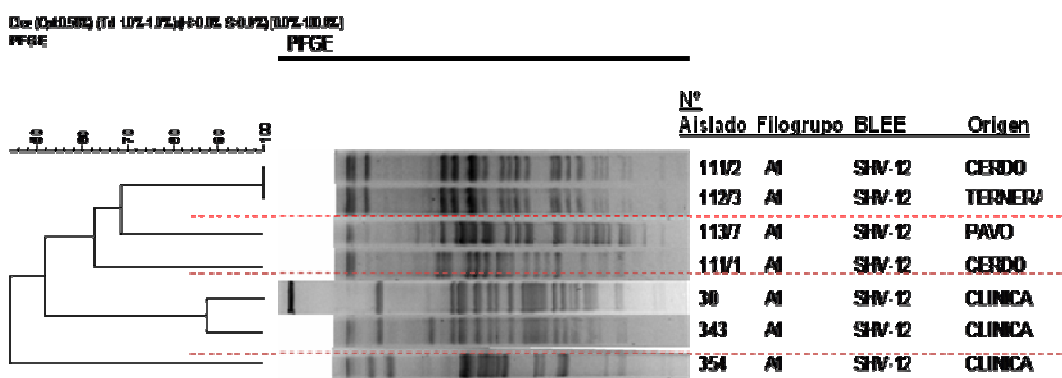


Figura 19. Dendrograma obtenido mediante PFGE con *Xba*I de aislados productores de SHV-12 y pertenecientes al filogrupo A1. Entre líneas se muestra la relación clonal entre aislados de *E. coli* del filogrupo A1 productores de SHV-12

5.6.2 Estudio de clonalidad de *E. coli* productor de CTX-M-15

Del total de 20 aislados de *E. coli* productores de CTX-M-15 obtenidos, 17 eran de origen clínico y 3 de origen alimentario. Entre los aislados de *E. coli* de origen clínico, 13 habían sido asignados al grupo filogenético B2₃ y 4 al filogrupos A. De los 3 aislados de origen alimentario, 2 pertenecían al filogrupos A1 y 1 al B1. Se estudiaron los filogrupos A1 y B2₃.

5.6.2.1 *E. coli* productor de CTX-M-15, filogrupos B2₃

Entre los 13 aislados de *E. coli* productores de CTX-M-15 pertenecientes al grupo filogenético B2₃, procedentes de muestras de orina (9), hemocultivos (3) y un líquido pleural (1), se identificó un grupo clonal (>85% similitud; Figura 20) integrado por 11 aislados (8 de casos de ITU y 3 de hemocultivos). En todos se amplificaron los genes de virulencia *afa/dra*, *iucD*, y *fimH*, por lo que se consideraron ExPEC como se ha mencionado previamente, y los genes codificantes de las enzimas *aac(6')-Ib-cr* y *bla_{OXA-1}*. Además mostraron resistencia a ácido nalidíxico, ciprofloxacino, tobramicina y trimetoprim-sulfametoxazol. Todos los aislados pertenecían al serogrupo O25.

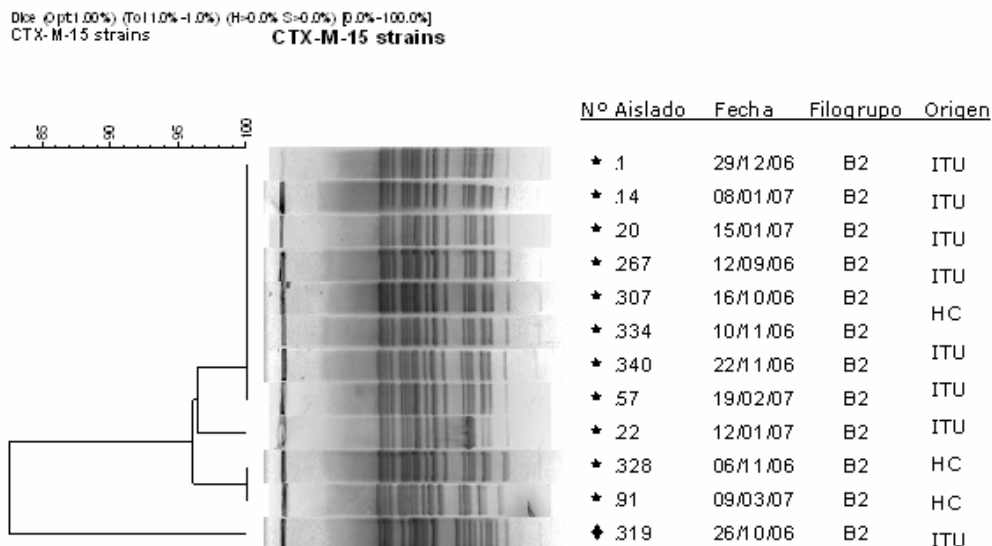


Figura 20. Dendrograma obtenido mediante PFGE con *Xba*I de de los aislados de *E. coli* productores de CTX-M-15, filogrupos B2₃. ITU: infección del tracto urinario; HC: hemocultivo

5.6.2.2 *E. coli* productor de CTX-M-15, filogrupo A1

Se estudiaron los 6 aislados productores de CTX-M-15 pertenecientes al filogrupo A1. Se obtuvieron 6 pulsotipos diferentes que mostraron un 73,9% de similitud. Cinco de estos 6 aislados se agruparon con un 81,2% de similitud formando 2 grupos clonales con un porcentaje de similitud superior al 85% cada uno de ellos. En la figura 21 se observan ambos grupos clonales entre líneas. El primero estaba compuesto por 3 aislados de origen clínico del serotipo ONT y el segundo por dos aislados de origen alimentario con serotipo O55. Estos 5 aislados poseían los mismos genes de virulencia (*fimH* y *iucD*) y el serotipo H9. El aislado restante pertenecía al serotipo ONT:NM (No Tipable; Non-Motile). Los 6 aislados analizados fueron clasificados como pertenecientes al ST410.

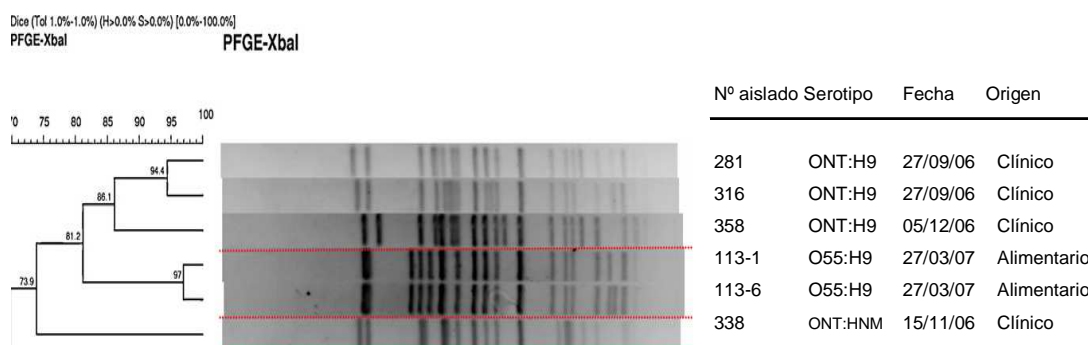


Figura 21. Dendrograma obtenido mediante PFGE con *Xba*I de aislados de *E. coli* productores de CTX-M-15, pertenecientes al filogrupo A y ST410

5.6.3 Estudio de clonalidad de otros aislados ECBLEE

En la Figura 22 se muestra el dendrograma de un grupo de aislados entre los que se observan 2 aislados de *E. coli* productores de CTX-M-9 pertenecientes al filogrupo B1 con una similitud superior al 95%. Los dos se recuperaron de muestras de orina y eran resistentes a fluorquinolonas. La adquisición se consideró de origen comunitario en un caso (nº aislado 273) y relacionado con la atención sanitaria en otro (nº aislado 75).

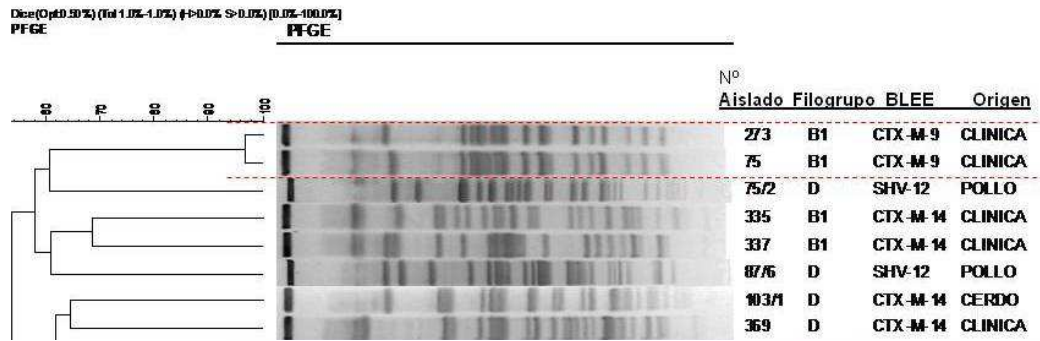


Figura 22. Dendrograma obtenido mediante PFGE con XbaI de aislados ECBLEE. Entre líneas se muestran los dos aislados con un índice de similitud >95%

5.7 Caracterización de plásmidos

5.7.1 Plásmidos de *E. coli* productor de CTX-M-15 pertenecientes al filogruppo A1

Se procedió al análisis de los plásmidos de estos aislados para estudiar la relación con plásmidos del grupo clonal O25b. Se consiguió transferir la resistencia a cefalosporinas mediante conjugación en 1 aislado clínico (316) y mediante transformación en *E. coli* DH10B en los 5 aislados restantes.

En todos los transformantes y en el transconjugante se realizó el despistaje de BLEE mediante la técnica de doble disco y se confirmó por PCR la presencia de la betalactamasa transferida. Como se observa en la Figura 23, el tamaño estimado de los plásmidos analizados se situó entre 89 y 119 kb. Todos los plásmidos pertenecían al grupo de incompatibilidad IncFIB.

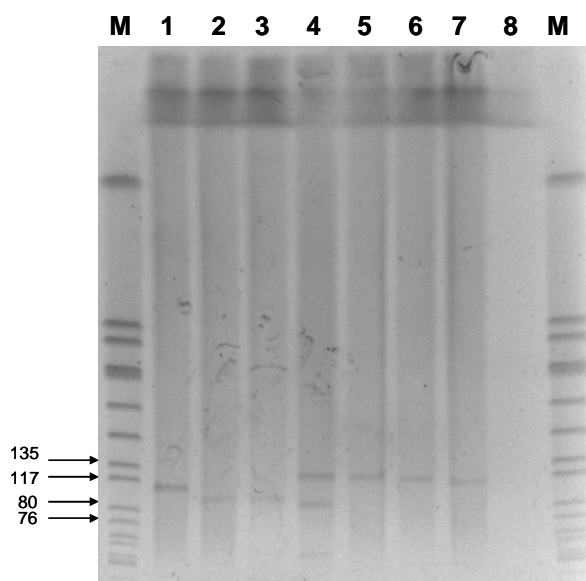


Figura 23. Electroforesis de los productos de restricción con S1 de plásmidos portadores de CTX-M-15. Calle M, patrón de peso molecular, *S. aureus* NCTC 8325 digerido con la enzima *Sma*I.; calle 1, cepa de *E. coli* O25:H4-ST131; calle 2, TF113/1; calle 3, TF 113/6; calle 4, aislado no relacionado con el estudio; calle 5, TF281; calle 6, TF 338; calle 7, TF358; calle 8, *E. coli* J53 sin plásmido

Los plásmidos de las 5 cepas integrantes de los dos grupos clonales generaron patrones de restricción con *Hpa*I diferentes (Figura 24 A). Los determinantes de resistencia *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM}, *tetA*, *catB3* y *aac(6')-Ib*, así como una secuencia parcial de Tn5403 se detectaron mediante PCR en todos los transconjugantes y transformantes. Para el determinante de resistencia *aac(3)-II* no se obtuvo amplificación por PCR, pero si hibridación positiva con sonda.

La hibridación con sondas de ADN mostró que el gen *bla*_{CTX-M-15} se localizaba en 2 o 3 fragmentos de alto peso molecular (Figura 24 B) y que los determinantes *aac(6')-Ib* (Figura 24 C) y *aac(3)-II* se localizaban ambos en el de mayor tamaño.

Los resultados de secuenciación pusieron de manifiesto un entorno genético idéntico aguas arriba del gen *bla*_{CTX-M-15} en todos los plásmidos (Figura 25). El gen de la transposasa IS26 se localizó 48 pares de bases aguas arriba de una *ISEcp1* parcialmente truncada (545 pb). En todos los casos se confirmó la presencia de la región del promotor putativo del gen *bla*_{CTX-M-15} (Número de acceso de GenBank GU479916 en *E. coli* 113-1).

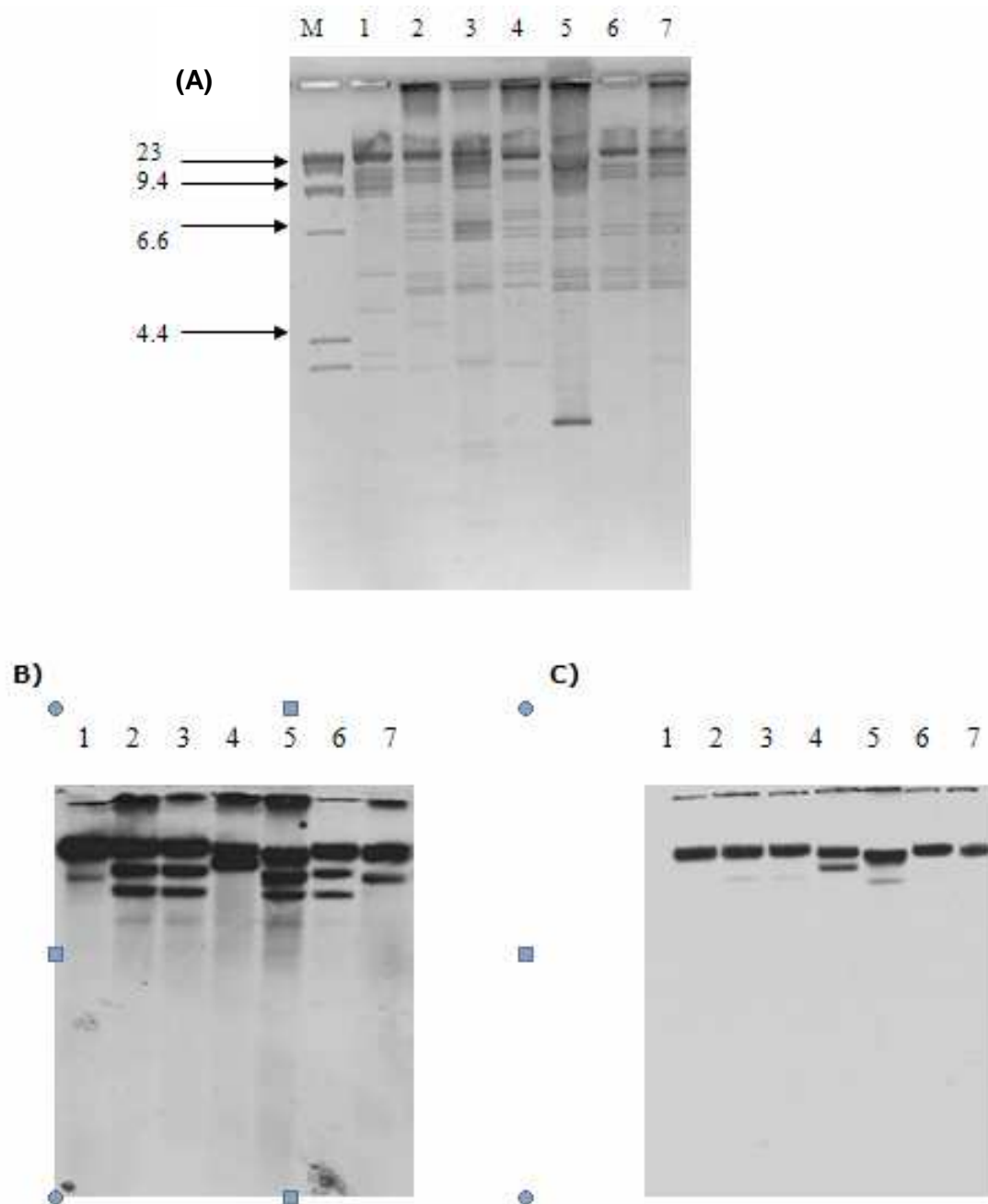


Figura 24. Restricción de ADN plasmídico digerido con *HpaI* (A) e hibridación utilizando como sonda *bla*_{CTX-M-15} (B) y *aac(6')-Ib* (C). Calle M, marcador de peso molecular (ADN fago λ digerido con *HindIII*); calle 1, *E. coli* O25:H4-ST131, filogrupo B₂₃; calle 2, TF28; calle 3, TC316; calle 4, TF358; calle 5, TF113/6, calle 6, TF113/1; calle 7, TF338.

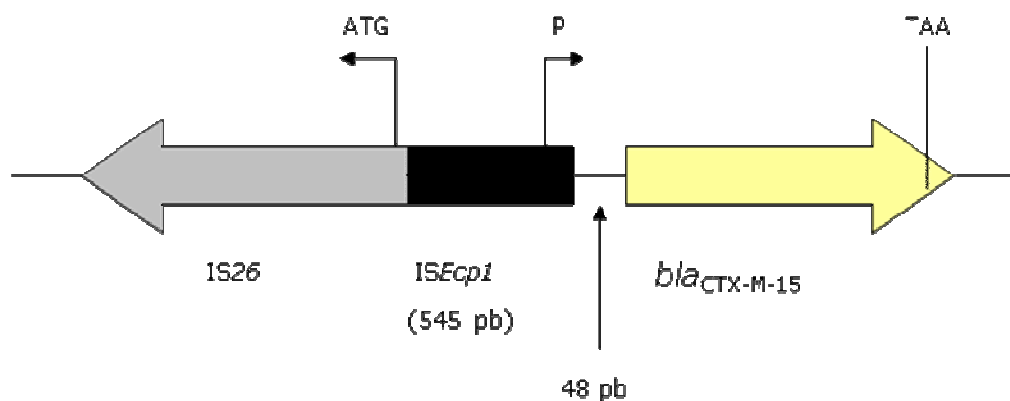


Figura 25. Representación esquemática del entorno genético del gen *bla*_{CTX-M-15} en aislados de *E. coli* pertenecientes al filogrupa A1. P: promotor putativo

5.7.2 Plásmidos de *E. coli* productor de SHV-12 pertenecientes al filogrupa A1

Todos los aislados productores de SHV-12 pertenecientes al filogrupa A1 se seleccionaron para la caracterización del grupo de incompatibilidad plasmídico. Se analizaron 25 (46,3% de los productores de SHV-12) aislados de origen alimentario y 11 (36,7%) de origen clínico. Para llevar a cabo el análisis se obtuvieron transconjugantes (n=34) o transformantes (n=1) de todos los aislados excepto de uno procedente de una muestra de origen alimentario. El grupo de incompatibilidad mayoritario tanto entre plásmidos clínicos como en los de origen alimentario fue I1. Treinta y dos (88,9%) plásmidos fueron asignados a este grupo de incompatibilidad, 22 (91,7 %) de origen alimentario y 10 (90,9%) de origen clínico. Entre los de origen clínico, 8 (80%) eran de origen comunitario, 1 de origen nosocomial y 1 de relacionado con la atención sanitaria. Otros grupos de incompatibilidad minoritarios encontrados fueron IncF e IncN. Entre los 32 aislados con plásmidos del grupo IncI1, 27 (84,4%) pertenecían a 2 STs mayoritarios, ST3 y ST26. Al primero se asignaron 17 (53,1% de los Inc1) aislados (11 de origen alimentario y 6 de origen humano) y al segundo 10 (31,3%) aislados (8 de origen alimentario y 2 de origen humano). Otros STs plasmídicos encontrados fueron ST 99, 100 y 103 (Tabla 46).

En este trabajo no se ha encontrado co-transferencia de otros determinantes de resistencia mediada por los plásmidos portadores del *bla*_{SHV-12}. Tan sólo en el caso

Resultados

del plásmido asignado al grupo de incompatibilidad IncN se transfirió conjuntamente resistencia a un antimicrobiano adicional, cotrimoxazol.

	Nº aislados clínicos			Nº aislados alimentarios				Nº Total (%)
	Nosocomial N=1	RAS N=1	Comunitario N=9	Pollo N=13	Pavo N=9	Cerdo N=2	Tenera N=1	
Inc I1		1	9	11	9	1	1	32 (88,9)
ST3		1	5	4	6		1	17 (53,1)
ST26			2	5	2	1		10 (31,3)
ST99				1				1 (3,1)
ST100				1	1			2 (6,2)
ST103			2					2 (6,2)
Inc F				1		1		2 (5,6)
IncN	1							1 (2,7)
No tipable				1*				1 (2,7)

Tabla 46. Grupos de Incompatibilidad de plásmidos de *E. coli* productor de SHV-12 perteneciente al filogrupo A1 de origen clínico y alimentario. *No se obtuvo transconjugante o transformante. ST: Secuenciotipo; RAS: relacionado con la atención sanitaria

Discusión

6. DISCUSIÓN

El aumento en la prevalencia de infecciones por ECBLEE y la diseminación de estos microorganismos en la comunidad supone un problema de salud pública a nivel mundial (95, 152). Aunque se han propuesto multitud de hipótesis para intentar explicar la diseminación de estos microorganismos en la comunidad, no se conocen con exactitud los reservorios de mayor importancia ni los mecanismos que han facilitado la dispersión, lo que dificulta la implantación de medidas de prevención y control.

Es evidente que la epidemiología de las infecciones por ECBLEE es compleja. Desde el punto de vista molecular, los cambios más notables han sido que, durante la última década, las BLEE tipo CTX-M han reemplazado a las de tipo TEM y SHV a nivel mundial, convirtiéndose en las enzimas que más frecuentemente originan resistencia a cefalosporinas de tercera generación (153). Este cambio ha venido acompañado por la emergencia de infecciones comunitarias por ECBLEE (87, 99). En los últimos años, además, hemos asistido a la aparición y rápida diseminación de un complejo clonal altamente exitoso a nivel mundial, O25b:H4-ST131, que vehiculiza principalmente plásmidos con CTX-M-15(110). Se han planteado diversas hipótesis para explicar la extraordinaria diseminación de las BLEE y la ocurrencia de estos cambios; estas hipótesis no sólo pueden ser no excluyentes, sino que en algunos casos pueden ser complementarias.

Previamente al diseño de este trabajo de investigación se había descrito la presencia de enterobacterias productoras de BLEE en muestras fecales de animales destinados al consumo humano (136) y, con menor frecuencia, en alimentos de origen cárnico (154). En 2003 en España, a partir de los aislados recogidos en la red nacional de vigilancia de resistencia antimicrobiana veterinaria (Veterinary-Antimicrobial-Resistance-Surveillance -VAV-), se detectó que el 2,4% de los aislados que producían infecciones en animales de producción eran ECBLEE y el 6,3% de los pollos estaban colonizados rectalmente por ECBLEE (108). Otro estudio llevado a cabo en Hong Kong en 2002 en otro tipo de animales (vacas, cerdos, palomas) detectaba una colonización intestinal del 3% (130). Posteriormente en nuestro país, en un análisis realizado en Cataluña, se encontró ECBLEE en 3 de 738 muestras de comida y en 19 de 61 brotes alimentarios (136).

La hipótesis de este trabajo fue que determinados alimentos podrían ser reservorios de ECBLEE o de las BLEE y los elementos genéticos móviles que las portan, y que las bacterias de origen animal y/o los elementos genéticos móviles que codifican las BLEE podrían diseminarse en la comunidad a través de la cadena alimentaria y, por tanto, jugar un papel importante en la epidemiología de la infección por ECBLEE en humanos. Para validar estas hipótesis se analizó un grupo de muestras de origen alimentario mayoritariamente de origen cárnico, con el fin de aislar los posibles ECBLEE colonizadores de las mismas. Estos aislados, las BLEE que expresaban y un conjunto de plásmidos de interés fueron caracterizados y comparados posteriormente con un grupo de aislados de origen clínico humano, con el fin de determinar si existía relación entre aislados humanos y de origen animal.

6.1 Características de ECBLEE de origen clínico

En nuestro estudio, el 3% de los aislamientos de *E. coli* de muestras clínicas producían BLEE. En España se han llevado a cabo varios estudios nacionales de prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE. En el año 2000, el Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH) de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) realizó el primer estudio multicéntrico de infecciones por *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE (GEIH-BLEE-2000) (155). En el mismo se obtuvo una prevalencia media en España de infección por ECBLEE del 0,5% respecto al total de cepas de *E. coli* aisladas de muestras clínicas. En nuestra área hospitalaria, Romero y cols. encontraron entre los años 1995 y 2003 una prevalencia media del 1,7% (5), similar a la obtenida en Barcelona, del 1,9% en el año 2003 (136). En el año 2006 se realizó un segundo estudio multicéntrico en España (GEIH-BLEE-2006), en el que se se observó que la prevalencia había aumentado hasta el 4% (156). La prevalencia de infecciones producidas por ECBLEE encontrada en el presente estudio, realizado entre 2006 y 2007, fue similar a la encontrada a nivel nacional en 2006 (156).

Este fenómeno no sólo ha venido ocurriendo en España, sino que se ha observado un incremento en la prevalencia de infecciones por ECBLEE en los últimos años en todo el mundo. En Europa existe una red de vigilancia de resistencia a antimicrobianos que incluye aislados invasivos (EARS-Net, perteneciente al Centro Europeo para el Control y la Prevención de Enfermedades -www.ecdc.europa.eu-), en cuya página web puede consultarse, entre otras, la evolución de las tasas de resistencia a cefalosporinas de tercera generación, que supone en general un buen

marcador de la prevalencia de BLEE. Como se aprecia en la Figura 26, los datos recogidos por el EARS indican un aumento generalizado en todos los países de la resistencia a cefalosporinas de tercera generación, debido principalmente a las BLEE, en aislados invasivos de *E. coli*. Según el informe de 2012, el 11,8% de los aislados de *E. coli* recogidos en Europa presentan resistencia a cefalosporinas de tercera generación y entre 80% y el 100% de los casos, según el país, está causada por la expresión de BLEE.

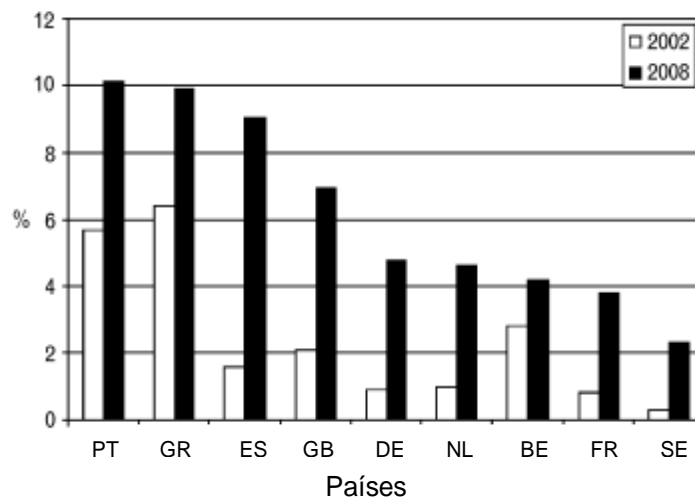


Figura 26. Resistencia a cefalosporinas de tercera generación en aislados de *E. coli* de hemocultivos en distintos países europeos (2002-2008). (Fuente: European Antimicrobial Resistance Surveillance System-EARSS) PT, Portugal; GR, Grecia; ES, España; GB, Gran Bretaña; DE, Alemania, NL, Holanda; BE, Bélgica; FR, Francia; SE, Suecia

Además, disponemos de diferentes estudios de prevalencia de resistencias, como el MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) (157, 158), el TEST (Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial) (159) o el SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends) (160), que permiten comparar con datos de resistencia a nivel mundial. En 2006 la prevalencia de infecciones por ECBLEE se situó en torno al 7,6% en Europa, 12% en Asia y 13,5% en América del Sur (159). En EEUU, aunque son mayoritarias las betalactamasas de tipo AmpC, como CMY-2, también se ha observado un incremento en prevalencia de infecciones por *E. coli* productor de enzimas CTX-M, sobre todo de origen comunitario, pasando de ser anecdótica a finales de los años 90 (161), a un 2,2% en el periodo 2004-2006 (159).

Estudios posteriores muestran un aumento de hasta el 8% en algunos hospitales (91, 162).

Como hemos visto, las infecciones por ECBLEE son un problema sanitario reconocido en todos los países europeos. No obstante, como se aprecia en la figura 2, existen variaciones geográficas importantes en la prevalencia (y también en la distribución de los tipos de BLEE) entre países, e incluso a un nivel más local. Por ejemplo, en Europa, la prevalencia de ECBLEE es mayor en Europa del Este que en los países del norte. En países como Rumanía, Turquía y Bulgaria se observaron tasas de resistencia a cefalosporinas de tercera generación en 2006 de 41%, 33% y 29% respectivamente, mientras en Estonia se mantuvo por debajo del 1% (www.ecdc.europa.eu).

Es conocido que existe una asociación entre la producción de BLEE en *E. coli* BLEE y una mayor frecuencia de resistencia a algunos antimicrobianos no beta-lactámicos como aminoglucósidos, cotrimoxazol y quinolonas (87, 163), hecho que dificulta enormemente la instauración de un tratamiento empírico adecuado. Los genes determinantes de resistencia a aminoglucósidos (distintas enzimas modificantes y metilasas), cotrimoxazol y sulfonamidas están localizados en un amplio rango de elementos genéticos móviles como integrones de clase 1, 2 y 3 y han sido asociados con varios plásmidos portadores de BLEE de origen humano y animal (164-167), lo que explica la asociación anterior. La resistencia a quinolonas puede estar determinada por diferentes mecanismos, siendo el más frecuente la aparición de mutaciones en los genes codificantes de las topoisomerasas *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*, que conllevan un cambio estructural de estas proteínas en el sitio de unión a quinolonas. Otros mecanismos importantes, aunque menos frecuentes, son la alteración de porinas de membrana y los mecanismos mediados por plásmidos: la sobreexpresión de bombas de expulsión QepA y OqxAB, acetilación de algunas quinolonas por la acetiltransferasa de aminoglucósidos modificada Aac(6')-Ib-cr y la protección de la diana por los productos de los genes *qnr* (quinolone resistant) (168).

La descripción de los mecanismos plasmídicos de resistencia a fluorquinolonas ha ido en aumento paralelamente al incremento en la resistencia a estos antimicrobianos (169). El fenotipo que confieren, una disminución de la resistencia a ciprofloxacino junto a una resistencia de bajo nivel a ácido nalidíxico (en algunos casos sensibilidad), puede ser causado por otros determinantes y además, no es infrecuente que quede enmascarado por otros mecanismos que confieren un nivel de resistencia mayor. Estos factores, junto con su posible localización cromosómica, han dificultado

enormemente el poder estimar la prevalencia en enterobacterias de los distintos determinantes plasmídicos de resistencia a quinolonas. Diferentes trabajos han comunicado cifras de prevalencia con un amplio rango, desde 0,2% al 94%, en función de los criterios de inclusión y el origen de los aislados (168, 170). En España, la prevalencia de genes *qnr* entre ECBLEE de origen clínico parece ser baja (1,1%) e inferior a la de *aac(6')-Ib-cr* (12,7%) estando este último frecuentemente asociado a CTX-M-15 (171).

La evidencia muestra que muchos de los genes de resistencia adquiridos en enterobacterias se encuentran frecuentemente agrupados en grandes regiones (*multi-drug resistance regions* o MDRR) que acumulan determinantes de resistencia a diferentes familias de antibióticos y antisépticos. Si determinados elementos genéticos móviles se insertan en una localización de un plásmidos que no produce efectos deletéreos puede actuar como "elemento o plataforma fundadora" (172) que proporciona una diana para posteriores inserciones. Estos eventos son raros, pero una vez que ocurren, si "capturan" algún determinante de resistencia que suponga una ventaja bajo presión selectiva, favorecen su diseminación y también la captura de otros determinantes de resistencia. Es lo que se ha denominado "capitalismo genético" (173). Una característica de estas MDRR es que vehiculizan los determinantes de resistencia en estructuras fijas o módulos. En el caso de las BLEE se han descrito una o dos configuraciones modulares o entornos genéticos para cada gen *bla*. Esto quiere decir que la captura de cada gen no se ha producido al azar en diferentes ocasiones, sino que se ha producido en una o dos veces únicamente, y después esta estructura se disemina a patógenos como las enterobacterias arrastrando con ellos los otros determinantes de resistencia (174). En la Tabla 47 se exponen los entornos conocidos que vehiculizan genes codificantes de BLEE.

Tipo de elemento genético	Nombre	BLEE asociada
Transposón	Tn3	Enzimas TEM
Secuencia de inserción (IS)	IS26	Enzimas SHV
	<i>ISEcp1</i>	Enzimas CTX-M 1 Enzimas CTX-M-9 Enzimas CTX-M-2
	<i>ISCR1</i>	CTX-M-1 CTX-M-2 CTX-M-9
Integrón (In)	IN35 (Integrón tipo <i>Sul-1</i>)	CTX-M-2
	IN60 (Integrón tipo <i>Sul-1</i>)	CTX-M-9
Estructura Fago-like		CTX-M-10

Tabla 47. Elementos genéticos asociados a la movilización de BLEE. Revisado en Poirel y cols. 2008 (3) y Sabaté y cols. 2002 (4)

En nuestro estudio, los porcentajes de resistencia a antimicrobianos no betalactámicos son similares a los descritos en la literatura para ECBLEE. En España, Oteo y cols. (175) encontraron que el 81,4% de los ECBLEE procedentes de diversos hospitales españoles eran resistentes a ciprofloxacino, el 66,2% mostraron resistencia a cotrimoxazol, 27,7% a tobramicina y el 13,4% a gentamicina (78,2%, 61,5%, 24,3% y 7,7% respectivamente en nuestro trabajo). Además, al igual que en nuestro caso, estos autores señalan una asociación significativa entre la resistencia a aminoglucósidos y la producción de CTX-M-15, lo podría ser debido a la asociación que encontraron entre la presencia del gen *bla* CTX-M-15 y el de la acetilasa de aminoglucósidos modificada *aac(6')-Ib-cr*. Este gen codifica una variante de la acetiltransferasa de aminoglucósidos *Aac (6')-Ib*, que originalmente confiere resistencia a kanamicina, tobramicina y amikacina (176). Dos sustituciones en los codones 102 (Trp→Arg) y 179 (Asp→Tyr) parecen ser necesarias para conferir a la variante enzimática la capacidad de acetilar determinadas fluorquinolonas como el ciprofloxacino y el norfloxacino, limitando su actividad (177).

Los trabajos de prevalencia en otros países anteriormente citados no proporcionan información sobre la procedencia nosocomial o comunitaria de los aislados estudiados. Generalmente, la procedencia de ECBLEE se detalla sólo cuando el análisis se hace a nivel local. En nuestro caso, la mitad de los aislados procedían de infecciones comunitarias (49%), siendo el 28% de origen nosocomial y el 23% de infecciones relacionadas con la atención sanitaria. Como se observa en la Tabla 48, esta frecuencia de aislados comunitarios supera las cifras estimadas por GEIH-BLEE-2006 en España (156), donde el origen de la infección por ECBLEE fue comunitario estricto en el 32% de los casos, nosocomial en el 31%, y relacionado con la asistencia sanitaria en un 37%. En general, estos resultados están en concordancia con la tendencia al aumento de las infecciones comunitarias por ECBLEE observada en numerosos análisis observacionales (7, 94, 99, 100, 113).

ORIGEN	Prevalencia ECBLEE (%)	
	GEIH-BLEE-2006	Este estudio
Nosocomial	31	28
Relacionado con atención sanitaria	37	23
Comunitario estricto	32	49

Tabla 48. Prevalencia de infecciones por ECBLEE en función del origen en los estudios GEIH-BLEE-2006 y el estudio actual

Quando se analizan en el presente estudio los porcentajes de aislados por el tipo específico de BLEE que producían, se aprecian 3 hechos destacables. En primer lugar, el conjunto de aislados productores de enzimas tipo CTX-M fue el más prevalente, seguido de los productores de enzimas del grupo SHV. En segundo lugar, la BLEE más prevalente en nuestra área fue SHV-12 superando en frecuencia a CTX-M-14. En tercer lugar, como se observa en la Tabla 49, se observó un incremento considerable de aislados productores de enzimas del grupo CTX-M-1, concretamente del tipo CTX-M-15 y una disminución acusada de las enzimas del tipo CTX-M-9 respecto a anteriores resultados del GEIH. En concordancia con estos resultados, Blanco y cols. (178) destacan la baja prevalencia de *E. coli* productor de CTX-M-9 (1%) entre ECBLEE aislados en un hospital gallego en el año 2006 y un aumento

significativo en la frecuencia de productores de CTX-M-15 hasta situarse en un porcentaje igual al encontrado en Sevilla (21,9%).

Tipo de BEE	% Aislados con BLEE		
	GEIH 2000	GEIH 2006	Estudio actual 2006-2007
Grupo SHV	28,9	26,8	38,5
SHV-12	23,9	26,8	38,5
Grupo CTX-M-9	52	55,1	37,1
CTX-M-14	20,5	46,8	33,3
CTX-M-9	27,3	8,3	3,8
Grupo CTX-M-1	0	17	24,4
CTX-M-15	0	14,6	21,8
Otras	0	2,4	2,6
Grupo TEM	19	1,2	0

Tabla 49. Frecuencia de los distintos tipos de BLEE en aislados de *E. coli* de los estudios GEIH-BLEE 2000, GEIH-BLEE-2006 y de este trabajo

Aunque las primeras descripciones de BLEE de tipo CTX-M se realizaron en aislados de *E. coli*, se ha documentado la existencia previa de brotes causados por aislados de *Salmonella* spp. no tifoidea en América del Sur a finales de los 80 (69, 179). En la segunda mitad de la década de los 90 comienzan a reportarse de manera frecuente casos desde diferentes localizaciones como Rusia (180), Grecia (181) o Letonia (182), siendo a partir del año 2000 cuando se inicia una diseminación explosiva de estas enzimas (40-43, 72, 111, 183-185). En España se describe por primera vez la presencia de una enzima CTX-M-9 en 3 aislados de *S. enterica* recuperados entre 1997 y 1998 (72). En la Tabla 50 se presenta la cronología de la aparición de BLEE del grupo CTX-M.

Nombre (designación original)	País (año)	Especie	Referencia
FEC-1	Japón (1986)	<i>E. coli</i>	(68)
CTX-M-1 (MEN-1)	Francia/Italia (1989)	<i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i>	(40,186)
	Alemania (1989)	<i>E. coli</i>	(187)
CTX-M-2	Argentina (1992)	<i>Salmonella</i> no tifoidea, <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>C. freundii</i> , <i>S. marcescens</i> , etc.	(69,179,188)
	Paraguay y Uruguay (1994)	<i>Salmonella</i> no tifoidea	(179)
	Israel (1992), Paraguay (1994)	<i>K. pneumoniae</i>	(69)
CTX-M-3	Polonia (1996)	<i>C. freundii</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>E. cloacae</i> , etc.	(189-192)
	Francia (1998)	<i>E. cloacae</i>	(193)
CTX-M-4	Rusia (1996), Hungría (1998)	<i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	(194,195)
	Letonia (1996)	<i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	(182)
CTX-M-6	Grecia (1997)	<i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	(196)
CTX-M-7	Grecia (1996)	<i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	(181)
CTX-M-8	Brasil (1996)	<i>E. cloacae</i> , <i>C. amalonaticus</i> , <i>E. aerogenes</i> .	(197)
CTX-M-9	Francia (1994)	<i>E. coli</i>	(40)
	España (1996)	<i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i> serovar Virchow	(72,198)
	China (1997)	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i>	(41)
CTX-M-10	España (1990)	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i>	(75)
CTX-M-12	Kenya (1999)	<i>K. pneumoniae</i>	(199)
CTX-M-13	China (1998)	<i>K. pneumoniae</i>	(41)
CTX-M-14 (CTX-M-18, Toho-3 y UOE-2)	Francia (1994)	<i>E. coli</i>	(40)
	Korea (1995)	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. sonnei</i>	(200,201)
	China (1998)	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> ,	(41)

Nombre (designación original)	País (año)	Especie	Referencia
		<i>E. cloacae</i>	
	España (2001)	<i>E. coli</i>	(202)
CTX-M-15 (UOE-1 y CTX-M-11)	India (1999)	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. aerogenes</i>	(111)
	Polonia (1998)	<i>E. coli</i> , <i>S. marcescens</i>	(203)
CTX-M-16	Brasil (1996)	<i>E. coli</i>	(42)
CTX-M-17	Vietnam (1997)	<i>K. pneumoniae</i>	(204)
CTX-M-19	Francia/Vietnam (1999)	<i>K. pneumoniae</i>	(205)
CTX-M-20	Francia (1998)	<i>P. mirabilis</i>	(40)
CTX-M-21	Francia (2000)	<i>E. coli</i>	(40)
CTX-M-26	Inglaterra (2001)	<i>K. pneumoniae</i>	(206)
CTX-M-27	Francia (2000)	<i>E. coli</i>	(207)
Toho-1	Japón (1993)	<i>E. coli</i>	(71)
Toho-2	Japón (1995)	<i>E. coli</i>	(208)
KLUC-1	Instituto Pasteur (2001)	<i>K. cryocrescens</i>	(209)
KLUA-1, KLUA-5 (CTX-M-5), KLUA-6, KLUA-8, KLUA-9, KLUA-10, KLUA-11	Instituto Pasteur (2002)	<i>K. ascorbata</i>	(210)
KLUG-1	DSMZ ^b (2002)	<i>K. georgiana</i>	(211)

Tabla 50. Cronología de la descripción de las enzimas CTX-M

En general, la irrupción de enterobacterias productoras de CTX-M a mediados de los años noventa modificó de una forma importante la epidemiología de las infecciones por ECBLEE, disminuyendo progresivamente la prevalencia de las enzimas hasta entonces más frecuentes, TEM y SHV, y aumentando las del grupo CTX-M, sobre todo en infecciones comunitarias (Tabla 51). Durante la vigilancia llevada a cabo en un área sanitaria de Sevilla entre 1995 y 2003, se observó a partir de 1999 un incremento anual constante de aislados *E. coli* productores de BLEE, del 0,27% al 4,7%, coincidiendo con la aparición de cepas productoras de CTX-M. Estas enzimas llegan a suponer el 61% al final del período de estudio (Figura 27) (5).

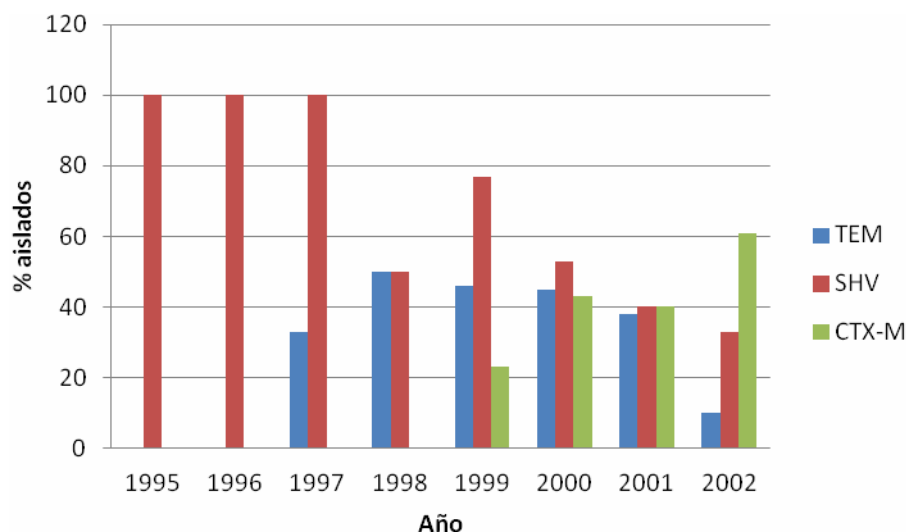


Figura 27. Prevalencia de ECBLEE en infecciones nosocomiales y comunitarias en España entre 1995 y 2003. Adaptado de Romero y cols. 2005 (5).

En 2003, Woodford y cols. detectaron una alta prevalencia de BLEE del grupo CTX-M-1 (96%) y más concretamente de CTX-M-15 en un estudio de vigilancia de resistencias en Reino Unido (7). Se consideró que el 24% eran de origen comunitario. En el mismo trabajo los autores describieron la presencia de una cepa epidémica en este país (38% de aislados), que fue denominada "cepa A". En 2007, Pitout y cols. publicaron los resultados de un estudio en el que analizan la epidemiología molecular de *E. coli* productor de CTX-M desde 2000 a 2005 en Calgary, Canadá (88). El 64% de los aislados productores de BLEE producían enzimas CTX-M (60% CTX-M-14, 36% CTX-M-1). Los autores describen un cambio en la prevalencia de estas dos enzimas mayoritarias durante el periodo de estudio. En los primeros 4 años predominaba CTX-M-14, agrupado en 2 clusters mayoritarios, 14A y 14AR (AR = >60% similitud con A) y asociado a brotes comunitarios del cluster 14A con un incremento progresivo de la frecuencia de CTX-M-1. Los aislados productores de CTX-M del grupo 1 se agruparon en 4 clusters (15A, 15AR, 15B y 15BR). La prevalencia de *E. coli* productor de CTX-M-15 pasó del 7% en el año 2000 a un 51% en 2005, siendo el aumento mucho mayor en los últimos 18 meses del estudio y estando ligado al incremento de aislados de los clusters 15A y 15AR en hospitales y centros de atención sanitaria, pero relacionados con una introducción previa desde la comunidad. A la vista del continuo cambio en la prevalencia de clones pandémicos productores de CTX-M, los autores destacan la importancia de llevar a cabo una estrecha vigilancia a nivel molecular de los aislados de la comunidad e investigar la introducción de los mismos en los hospitales.

Año	Período	Lugar	Nº aislados (%)	Tipo de BLEE	Referencia
1996-1997	4 meses	Francia	5 (0,48)	ND	(212)
1999	5 meses	Francia	5 (0,3)	3 TEM-24, 1 TEM-21, 1 TEM-15 + SHV-4	(213,214)
1999	12 meses	Granada	7 (0,2)	ND	(215)
1999	2 meses	Afula, Israel	42 (1,26)	ND	(216)
2000-2002	2 meses	Calgary, Canadá	111	55% CTX-M-14, 15% CTX-M-1 grupo	(217)
2000	4 meses	España	92	47,8% CTX-M-9 grupo, 23,9% SHV-12*	(92,155)
2001	10 meses	Galicia	7	5 (71%) CTX-M-14	(202)
1995-2003	9 meses	Sevilla	325 (1,5)	46% CTX-M, 44% SHV*	(5)
1999-2003	5 meses	Varese, Italia	29	CTX-M-1 grupo	(218)
2003	3 meses	York, Reino Unido	9 (1,6)	4 CTX-M-9 grupo, 4 CTX-M-15, 1 SHV-12	(219)
2003	4 meses	Italia	79 (3,5)	56% TEM, 32% SHV, 20% CTX-M*	(220)
2003	8 meses	Grecia	14	10 (71%) CTX-M-1 grupo	(221)

Tabla 51. Relación de estudios de enterobacterias productoras de BLEE en pacientes no hospitalizados. ND: No determinado * Porcentaje del total de aislados

Si bien los aislados productores de enzimas CTX-M se caracterizan por haberse dispersado en la comunidad, en el caso de las BLEE del grupo CTX-M-1, y más concretamente de CTX-M-15, se observa una cierta relación con la atención sanitaria. En nuestro estudio se encontró una asociación entre el origen de la infección y las BLEE del grupo CTX-M-1, que fueron más frecuentes en aislados de origen nosocomial (41%) que en los que procedían de la comunidad (16%). Blanco y cols. encontraron una asociación similar entre los aislados de *E. coli* productores de CTX-M-15 en Galicia (178).

La rápida emergencia y dispersión de *E. coli* productor de CTX-M-15 está ligado en gran parte, según se ha demostrado con posterioridad, a un grupo clonal altamente exitoso y virulento, O25b:H4-ST131 (88, 110, 146, 222-224), que pertenece al filogrupo B2 y corresponde a un solo serotipo, la variante b de O25:H4, y a un único clon identificado por MLST, el ST131. Las características de los aislados de este grupo se discutirán posteriormente. Diversos estudios de prevalencia de BLEE pusieron de manifiesto el desplazamiento en distintas zonas geográficas de las BLEE más

prevalentes por CTX-M-15. Nicolas-Chanoine y cols. (110) analizaron una colección de aislados de *E. coli* procedentes de Europa, Asia y América del Norte productores de CTX-M-15 para determinar si el aumento simultáneo en la prevalencia de esta enzima estaba ligado a la dispersión de un clon como se había descrito en Francia previamente (146). El 82% de 28 aislados procedentes de 3 continentes eran idénticos a los 13 aislados clonales de origen francés. Este complejo clonal es detectado en los cinco continentes entre 2003 y 2008.

En cambio, la significativa prevalencia de SHV-12 parece más un fenómeno circunscrito a España. El aumento en la frecuencia de esta enzima en aislados de *E. coli* de origen comunitario había sido descrito previamente en nuestra área geográfica (225), dónde se encontró que, entre 2001 y 2002, el 33% de aislados productores de BLEE de origen comunitario producían SHV-12. De igual manera y a nivel nacional, Rodríguez-Baño y cols. (105) determinaron en un estudio realizado con ECBLEE aislado de infecciones de origen comunitario entre 2002 y 2003, que un 28% de estos aislados eran productores de SHV-12. Estas cifras son similares a las obtenidas por Oteo y cols. en un trabajo posterior en el que estudian aislados ECBLEE de 22 hospitales españoles (175). El 34,2% de los aislados eran productores de SHV-12, situándose por delante de CTX-M-14 (23,4%) y sólo superada por los productores de CTX-M-15 (42,4%). En las series estudiadas en otros países la prevalencia de SHV-12, aunque significativa, es generalmente menor que en nuestra área. En Irlanda, Morris y cols. encontraron un 18% de enterobacterias productoras de SHV-12 entre 1997 y 2007 (226). En Italia, un estudio multicéntrico de 2003 (220) identificó un 10,8% de ECBLEE con un 18% de SHV. Dahmen y cols. señalan una prevalencia del 9% entre enterobacterias de origen clínico en Túnez en el año 2006, cifra similar a la reportada en Francia en 2004 (227) .

Los aislados de *E. coli* patógenos y comensales tienen antecedentes filogenéticos diferentes, derivando los primeros del filogrupo B2 mayoritariamente y en menor medida del D, y los segundos de los grupos A y B1 (79, 228). En cuanto a la distribución de los aislados ECBLEE de origen clínico por grupo filogenético encontrada en el presente trabajo, la mayor parte pertenecían al filogrupo B1 (30,8%), siendo frecuentes también los aislados de los filogrupos B2 (26,9%), A1 (24,4%) y D (16,7%). Si bien se esperaba una mayor prevalencia de aislados de los filogrupos tradicionalmente asociados con las infecciones extraintestinales (B2 y D), no es infrecuente encontrar aislados clínicos de los filogrupos A y B1. En Francia entre 1997 y 2002 se encuentran prevalencias de ECBLEE de los filogrupos A y B1 del 26,7 % y

10,4% respectivamente (142). En el estudio español de Blanco y cols. en el que estudian la epidemiología molecular de ECBLEE de los años 2006-2007 en Lugo (178), todos los aislados, a excepción de los productores de CTX-M-15, pertenecían con más frecuencia a los filogrupos A, B1 y D, siendo CTX-M-14 la BLEE predominante (57,1%), seguida de CTX-M-15 (21,9%) y SHV-12 (9,5%). En un estudio multicéntrico español en el que se estudian los filogrupos de ECBLEE causantes de bacteriemia, Rodríguez-Baño y cols. comunicaron una prevalencia de aislados de los filogrupos A y B1 mayor de la esperada (28,8% cada uno) que era incluso superior a la de los filogrupos B2 (15,7%) y D (26,7%) (229).

6.2 Características de ECBLEE de origen alimentario

6.2.1 Productos cárnicos frescos

Los resultados de los estudios de la prevalencia de ECBLEE en muestras cárnicas comercializadas al por menor engloban el análisis completo de la cadena alimentaria, desde los animales de producción hasta el producto final. Existen varios puntos críticos en los que puede producirse la contaminación por *E. coli* multirresistente del alimento disponible para consumo humano. En primer lugar, el grado de colonización intestinal por enterobacterias multirresistentes de los animales de producción de las granjas de cría, el impacto de esta colonización sobre la colonización ambiental, en los sistemas de transporte y en los mataderos, el grado de colonización de las canales (cuerpo del animal sacrificado y abierto, sin despojos) durante la evisceración y posterior envasado y transporte al detallista, así como la probabilidad de contaminación cruzada en los hogares (Figura 28). El estudio de muestras cárnicas crudas preparadas para el consumidor final proporciona información sobre el efecto acumulativo de los pasos previos de esta cadena.



Figura 28. Esquema de los puntos críticos de contaminación de la carne por *Escherichia coli*

El sector avícola es posiblemente el más claro exponente de los sistemas de producción ganadera intensiva. El desarrollo de la industria avícola vino marcado por la selección y reproducción de razas, líneas y variedades para obtener una alta productividad, por un lado de animales de carne (*broilers*) y por otro de productoras de huevos. El pollo *broiler* se caracteriza por usar el pienso más eficazmente, con un elevado índice de conversión (kg de pienso consumido /kg de peso vivo producido), crecen más rápido y llegan a su peso comercial entre los 38-48 días. En cuanto a la organización de la producción de *broilers*, casi la totalidad está “integrada” (<http://www.eumedia.es/articulos/mg/108subsectoravicola.html>), es decir, los pollos son cebados por avicultores a los que una empresa les sirve el animal de un día y el pienso, además de asesorarlos a nivel técnico. Finalmente la misma empresa recoge el pollo, lo procesa y comercializa el producto final.

Además, existen diferencias en el procesamiento de las canales de cada tipo de animal que pueden tener impacto en la colonización del producto final. La carne de aves es más perecedera. Esto es debido a su pH ligeramente más elevado y a la forma de sacrificio. Tanto en el aturdimiento como en el escaldado se utiliza agua, creando un ambiente húmedo y cálido que favorece el crecimiento microbiano. Además, el

riesgo se ve amplificado por la posibilidad de que los dedos de goma utilizados en el desplumado propaguen la contaminación de un animal a otro. El siguiente paso, la evisceración, constituye otro punto crítico de la cadena, que igualmente se realiza de manera automatizada. Todas estas operaciones han sido adaptadas a las exigencias de un ritmo de trabajo elevado, que procesa miles de aves por hora, pero que favorecen la contaminación por flora fecal de las canales de ave.

En el procesamiento de otro tipo de ganado, como el bovino y porcino, se somete al animal a una ducha con agua fría a presión al inicio del procesamiento para limpiar la piel. No se utiliza agua para el aturdimiento, que generalmente se realiza con CO₂ o aturdimiento eléctrico con pinzas en cerdos y con pistola neumática en el ganado vacuno, ni es necesario el desplumado. Aunque en el caso del cerdo tras el desangrado se escalda al animal con agua caliente, inmediatamente después se somete al chamuscado en horno de gas (a temperaturas de más de 900 °C) o con soplete, lo que obviamente destruye las bacterias de la piel. En el ganado bovino esta operación es sustituida por el desollado, que se realiza cuidadosamente, en ocasiones de manera manual e individual, puesto que las pieles se emplean posteriormente como subproducto. El paso posterior de evisceración, el más delicado desde el punto de vista higiénico, también se realiza en estos grandes animales de manera manual y generalmente se ligan esófago y recto para evitar la contaminación de la carne. Todas estas diferencias en el procesamiento pueden explicar que los productos finales crudos de cada tipo de carne muestren distintos niveles de colonización por microorganismos.

En nuestro estudio se detectó ECBLEE en 31 muestras de productos cárnicos crudos vendidos al por menor, que suponían el 28.4% de los productos cárnicos analizados. La carne de ave fue la más frecuentemente colonizada por ECBLEE, con un 70% de muestras positivas. Además, se observó que estas muestras procedían con más frecuencia de los establecimientos en la categoría de mercados. Este hecho podría tener origen en las diferentes condiciones en que se dispensan los productos en los establecimientos. Al contrario de lo que ocurre en supermercados y grandes superficies, los productos cárnicos crudos vendidos al por menor en los mercados visitados no estaban pre-envasados, lo que puede facilitar la contaminación cruzada ya sea por contacto o por la manipulación inadecuada o poco higiénica de los mismos. Este hecho puede explicar igualmente que todas las muestras cárnicas curadas en las que se detectó ECBLEE procedieran de este tipo de establecimientos.

La BLEE más prevalente fue SHV-12 (79%), seguida de CTX-M-14 (13.2%) y CTX-M del grupo 1 (7.4%). La colonización por ECBLEE no estaba en relación con el recuento de coliformes, es decir, no fue más frecuente la detección de ECBLEE en las muestras que presentaron mayor grado de contaminación. Además, en la mayoría de los casos fue necesario un proceso de enriquecimiento, lo que indica que la contaminación por ECBLEE en la mayoría de las muestras cárnicas era de muy bajo grado. Nuestros resultados muestran similitudes con lo que se ha descrito en otros trabajos realizados tanto en España como en otros países. En Túnez Jouini y cols. (137) recuperaron ECBLEE en el 29% de 34 muestras cárnicas y un alto porcentaje de muestras de origen aviar fueron positivas para ECBLEE (50%). En la península ibérica se han llevado a cabo estudios tanto en nuestro país como en Portugal. En España, Lavilla y cols (230) encontraron un 26,7% de muestras colonizadas por ECBLEE, llegando hasta el 57% en el caso de las muestras de origen aviar. En Portugal, Machado y cols. detectaron porcentajes de colonización de carne de pollo cruda similares, aunque como en el caso del estudio en Túnez, la prevalencia de los distintos tipos de BLEE fue diferente a la nuestra (231). La escasa frecuencia de aislamiento de ECBLEE en muestras de ternera en nuestro trabajo ha sido confirmada por otros autores (230). En el norte de Europa se observa igualmente una frecuencia de colonización muy elevada tanto en la carne de pollo como en la de cerdo. Cohen Stuart y cols. encontraron porcentajes del 84% (carne aviar orgánica) y 100% (carne aviar convencional) en Holanda en el año 2010 (232). También apreciaron diferencias significativas en la distribución de algunos tipos de BLEE, siendo más frecuente SHV-12 en muestras de pollo criado tradicionalmente y CTX-M-2, SHV-2 y TEM-20 exclusivas de este grupo de muestras. En Alemania se ha descrito una prevalencia de colonización por enterobacterias productoras de BLEE de carne aviar de origen orgánico/tradicional del 51%, sin observarse diferencias según el origen de las muestras (233) y de nuevo con SHV-12 como la BLEE predominante (43,9%), junto a CTX-M-1 (41,2%).

En nuestro estudio, los aislados procedentes de muestras alimentarias pertenecían mayoritariamente a los filogrupos típicamente considerados comensales, A (44%) y B1 (29%), aunque también fueron frecuentes los aislados del filogrupo D (22%). Nuestros resultados son muy similares a los descritos en un trabajo realizado en Barcelona en 2008 (230), donde encuentran que los aislados de muestras cárnicas y humanas (portadores) pertenecen al filogrupo A mayoritariamente (53% en portadores y 52% en alimentos), seguido del filogrupo B1 (18% y 34%) y filogrupo D (12,5% de y 13%). En otro trabajo realizado en Túnez, todos los aislados ECBLEE

recuperados de muestras cárnicas crudas pertenecían a los filogrupos A (31%) y B1 (69%) (234).

Es interesante saber en qué punto de la producción de alimentos cárnicos se produce la contaminación de estos productos por ECBLEE para poder planificar intervenciones eficaces. El impacto de la contaminación cruzada ocurrido en los mataderos ha sido estudiado con más detalle en especies bacterianas como *Salmonella* por ser una de las principales bacterias zoonóticas que originan enfermedades gastrointestinales en humanos. Diversos estudios han puesto de manifiesto que el sacrificio de pollos colonizados con *Salmonella* puede dar lugar a la contaminación de la carne y de las instalaciones donde se lleva a cabo y que, en muchas ocasiones, los métodos de desinfección utilizados no eliminan por completo las bacterias que contaminan las canales, pudiendo colonizar los productos cárnicos procesados con posterioridad (235-237). De manera similar a lo ocurrido en las canales, las jaulas donde se transportan las aves también continúan a menudo contaminadas tras los procesos de lavado y desinfección (237).

Recientemente se han publicado dos trabajos que hacen un análisis algo más detallado sobre la contaminación cruzada con ECBLEE en granjas. Laube y cols. tomaron muestras fecales de aves en 7 granjas a su llegada al criadero y en dos ocasiones más durante el proceso de engorde, además de muestras ambientales (suelos, comederos, abrevaderos, etc.). Excepto en la primera toma de muestras en una sola granja, en todos los casos encontraron *E. coli* productor de BLEE o AmpC (238). La prevalencia de muestras fecales positivas en las sucesivas tomas de muestras aumentaba significativamente (medias del 51% en la primera toma hasta 76% en la última), al igual que lo hacía la contaminación del entorno (rango 54%-100%). De 359 aislados de *E. coli* caracterizados, la BLEE más prevalente fue SHV-12, que era producida por el 23,4% de los aislados y sólo fue superada en frecuencia por una enzima de tipo AmpC, CMY (42,9%). Es llamativo que en dos granjas que pertenecían a la misma compañía se encontró casi exclusivamente SHV-12 junto a TEM-52, durante todo el proceso, lo que sugiere, tal y como afirman los autores, que cada cadena de producción alberga su propio conjunto de genes de resistencia. En el segundo trabajo se determina la frecuencia de colonización rectal o fecal de animales sanos por ECBLEE en 3 granjas porcinas danesas en las que se había detectado previamente carne colonizada (239). Se observó que los cerdos podían estar colonizados a cualquier edad, pero era más frecuente en cerdos recién nacidos (50%) que en cerdos listos para ser sacrificados (12%). Además, el recuento de ECBLE era

mayor en los animales más jóvenes (10^7 UFC/g en cerditos y 10^3 UFC/g en adultos). Los discordantes resultados de los estudios anteriores pueden ser un reflejo de las implicaciones que tienen las particularidades del proceso de cría de las aves en la probabilidad de colonización de los animales y contaminación del producto final, siendo quizás más probable la recirculación de aislados entre el entorno y los animales en los criaderos de aves que en otro tipo de ganadería. La única investigación disponible a día de hoy sobre la prevalencia de BLEE en granjas de recría de aves *broiler* apoya esta teoría. Las aves de recría son los parentales del *broiler*, que se utilizan solamente para reproducirse y dar lugar al animal que se sacrifica y se vende al consumidor final (*broiler*). Dierikx y cols. comprobaron que en estas aves de recría sólo se detecta AmpC, mientras que en las de los *broilers* (que aunque descienden de las primeras se crían en instalaciones diferentes) se detectan también BLEE, tanto en los animales como en muestras ambientales. La prevalencia de muestras positivas va en aumento durante el tiempo de engorde de los *broilers*, detectándose la contaminación del pienso a partir de la primera semana. El hecho de que se detecten muestras ambientales colonizadas incluso tras las operaciones de limpieza y desinfección pone de manifiesto que existe recirculación de aislados resistentes y contaminación cruzada en las granjas (240).

En concordancia con lo comentado, los resultados de una auditoría de en 73 naves de *broilers* de Huelva y Sevilla señalan que hay gran cantidad de instalaciones que no cumplen muchos de los requisitos elementales de bioseguridad e higiene. Algunos de los porcentaje de no cumplimiento encontrados por los autores son realmente llamativos. El 91% de las naves analizadas no tenía arco de desinfección a la entrada de la misma, el 87% no cumplían con la normativa sobre contenedores de residuos tóxicos (eran inadecuados, estaban abiertos, etc.), en el 87% se encontraron animales domésticos en las naves, el 54% no cumplía con las normas de desratización-desinfección-desinfectación de instalaciones y en el 76% la potabilización del agua no era adecuada. (<http://www2.avicultura.com/sa/007-012-Bioseguridad-Resultados-analiticos-Castillo-SA201201.pdf>).

6.2.2 Otros productos

Una vía adicional de dispersión de microorganismos portadores de BLEE es la contaminación cruzada en la cocina, desde productos cárnicos crudos colonizados a otros alimentos que se consumen frescos, como frutas o verduras. Por otra parte, la falta de higiene durante la manipulación de los alimentos por parte de personas

portadoras puede también ser causa de contaminación de los mismos. A este respecto, es interesante el hallazgo del estudio de portadores fecales llevado a cabo por Rodríguez-Baño y cols. donde se encontró que el hecho de haber almorzado en establecimientos de hostelería durante más de 15 días en el mes previo al estudio estaba asociado a un menor riesgo de ser portador (104). La formación exigida a los manipuladores de alimentos profesionales va encaminada a disminuir la contaminación cruzada entre los alimentos, lo que probablemente contribuye a que otros productos no cárnicos estén menos contaminados (241). En cambio, este tipo de educación sanitaria no está difundida en la población general y probablemente se produzca contaminación cruzada en los hogares con más frecuencia que en los establecimientos profesionales (242).

Existen pocos datos disponibles sobre la prevalencia de ECBLEE en otro tipo de alimentos que no sean de origen cárnico o bien de la posible presencia de ECBLEE en el alimento una vez cocinado. En nuestro estudio hemos encontrado una muestra de ensalada colonizada por ECBLEE, lo que supone un 3% de los alimentos vegetales crudos analizados. En España Mesa y cols. también encontraron colonización por ECBLEE en 2 (1,3%) de 155 ensaladas. En el mismo estudio los autores analizaron más de 500 muestras de alimentos cocinados entre las que únicamente hallaron un aislado de *K. pneumoniae* productor de BLEE (136). En nuestro caso, con un número mucho más reducido de alimentos cocinados analizados, tampoco se consiguió aislar ECBLEE. Lavilla y cols (230) analizaron 866 muestras de alimentos cocinados, encontrando colonización por enterobacterias productoras de BLEE en 3 (0,3%) de ellas. Se trataba de 2 muestras de ensalada y una de pollo cocinado con dos aislados de *E. coli* productores de CTX-M-14 y uno de *K. pneumoniae* productor de CTX-M-3. Nuestros resultados, junto con los comentados, apuntan a que la contaminación cruzada de productos que se consumen frescos, aunque es poco frecuente, se está produciendo en el entorno donde se manipulan los mismos. Los alimentos cárnicos están, en general, contaminados en bajo grado por ECBLEE y estos microorganismos suelen ser eliminados durante el proceso de cocinado, pero las superficies pueden quedar contaminadas, sobre todo si permanecen húmedas, y transferir esta contaminación a otros productos que se consumen frescos, como ya se ha observado para enterobacterias como *Salmonella* y *E. coli* O157 (243).

En nuestro trabajo los recuentos de colonización por coliformes de las cáscaras de huevo analizadas han sido muy bajos y no se ha detectado ECBLEE. En España, como en el resto de la Unión Europea, está prohibido el lavado de huevos, aunque se

permite tratarlos con luz ultravioleta o bien excluir aquellas unidades en las que se observa contaminación macroscópica. Estos procedimientos pueden explicar los resultados obtenidos. Sin embargo, la diferencia más notable respecto a lo que ocurre con los *broilers* es que las gallinas ponedoras no suelen tratarse con antimicrobianos como fluorquinolonas o cefalosporinas (Reglamento (CE) No 1177/2006 de la Comisión de 1 de agosto de 2006), hecho que podría igualmente justificar los diferentes resultados de prevalencia de ECBLEE. No obstante, en estudios realizados con muestras fecales de gallinas ponedoras se ha puesto de manifiesto que existe colonización del tracto gastrointestinal por ECBLEE. Bortolaia y cols. (244) analizaron 4 granjas danesas de gallinas ponedoras en las que se cumplía la normativa europea al respecto de la producción de huevos, que incluye restricciones en el uso de antibióticos, encontrando *E. coli* productor de CTX-M de los grupos 1, 2 y 9 en dos de las granjas, con una prevalencia del 3%. Musgrove y cols. también comunicaron la presencia de *E. coli* en las cáscaras de huevos de 3 plantas comerciales, aunque los aislados eran mayoritariamente sensibles a antimicrobianos (245).

6.3 Comparación de aislados de origen humano y alimentario

La mayoría de la literatura científica que hace referencia a la posible transferencia de determinantes de resistencia de los animales al hombre proceden, por un lado, de los estudio epidemiológicos de las zoonosis, sobre todo de las infecciones causadas por *Campylobacter* y *Salmonella*, y por otro, de los denominados "microorganismos indicadores", *E. coli* y enterococos, que pueden causar enfermedad en el hombre o formar parte de su flora. Respecto a estos dos últimos microorganismos, los datos han sido recogidos sobre todo en relación a la época en que determinados antibióticos se usaban como promotores de crecimiento y se dispone de poca información sobre la situación actual.

El primer paso para determinar la implicación de la cadena alimentaria en las infecciones en humanos es analizar las características comunes entre los aislados que están produciendo infección en el ser humano y los recuperados de origen animal. Encontrar similitudes entre los aislados de origen animal y humano puede tener dos lecturas, transferencia de un entorno al otro o exposición a una fuente común (9). En nuestro estudio, cuando se compararon las características de ECBLEE de origen animal y alimentario, se encontraron algunas diferencias pero también similitudes respecto al tipo de BLEE producida así como en los grupos filogenéticos predominantes, factores de virulencia, serogrupos predominantes y patrón de sensibilidad a antimicrobianos.

Analizando la frecuencia de BLEE, fue más prevalente la enzima SHV-12 en aislados de origen alimentario (79,4%) que en aislados de origen clínico (38,5%), pero hay que señalar que en ambos grupos de aislados esta BLEE fue la más abundante. En los aislados de origen clínico fue más frecuente la producción de BLEE del grupo CTX-M-9 que en los de origen alimentario (35,9% vs 13,2%), y lo mismo sucedió con las enzimas de grupo CTX-M-1 (25,6% en aislados clínicos vs 7,4% en aislados alimentarios). Revisando la literatura, se observa que es frecuente detectar la concordancia de un tipo de BLEE específico tanto en aislados de *E. coli* de origen clínico como en aislados procedentes de alimentos cárnicos crudos o heces de los animales de origen en una misma zona geográfica. En el trabajo de Machado y cols. (231), se encontró que el 90% de los ECBLEE aislados de muestras cárnicas aviares en Portugal producían TEM-52. En otro estudio de la misma autora (246), se describe la prevalencia de BLEE en enterobacterias en Portugal, siendo las de tipo TEM las más frecuentes (46%), con una representación de TEM-52 del 24%. Dhanji y cols. detectaron aislados productores de enzimas prevalentes en América del Sur, como CTX-M de los grupos 2 y 8, en ECBLEE aislados de carne importada de allí (247). De igual manera, Warren y cols. aislaron *E. coli* productor de CTX-M-2 en productos de origen aviar procedente de América del Sur, donde esta enzima es prevalente, con más frecuencia que en los aislados procedentes de muestras de otra procedencia (248). En Holanda, Leverstein-van Hall y cols. (249) encuentran que el 35% de los aislados de ECBLEE de origen humano portaban BLEE comunes en muestras de origen aviar y el 19% se encontraban en plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad.

Los datos anteriormente expuestos sustentan la hipótesis de que el intestino de los animales es un reservorio de diversos tipos de BLEE que a su vez son prevalentes entre aislados que causan infecciones en humanos y que puede jugar un papel importante en la epidemiología de estas infecciones. La concordancia observada entre las enzimas de aislados humanos y de origen cárnico puede ser debida a una transmisión a diferentes niveles como son (i) la transmisión de aislados, con lo que se observarían los mismos clones en ambos grupos; (ii) transmisión de plásmidos, detectaríamos plásmidos comunes; y (iii) elementos móviles comunes. Es necesario pues llevar a cabo el estudio de los plásmidos que portan las BLEE y de sus entornos genéticos (249,250). De hecho, experimentos in vitro han demostrado la capacidad de aislados de *E. coli* de origen aviar para persistir y transferir una BLEE a los aislados humanos en un entorno similar al del intestino humano (251). Los estudios de caracterización de plásmidos realizados se comentarán más adelante.

El hecho de que las enzimas del grupo CTX-M-1 se hayan dispersado rápidamente entre los aislados clínicos, pero no en los de origen animal, pone de manifiesto que muy probablemente coexisten dos vías de transmisión no necesariamente paralelas, una entre humanos y animales de producción de los filogrupos A y B1 productores de SHV-12 y enzimas del grupo CTX-M-9 y otra principalmente entre humanos. Sustentan esta hipótesis trabajos como el de Johnson y cols. (252), en el que se observa que los pulsotipos de aislados ST131 de origen humano y los que se han encontrado en alimentos y animales son en general diferentes, aunque puntualmente se haya descrito casos de relación clonal entre los mismos. Nuestros resultados, en concordancia con lo anterior, muestran que los aislados del filogrupo B2 eran mayoritariamente procedentes de muestras clínicas, no encontrándose además ninguno productor de CTX-M-15 (frecuentemente asociado al ST131) entre los de origen cárnico.

Se cree que la patogenicidad de *E. coli* está ligada a la expresión de múltiples factores de virulencia (FV) como son las adhesinas, sideróforos y toxinas, por lo que se esperaba que el conjunto de genes de virulencia expresados por cepas patógenas y comensales fuera diferente. Nuestro interés era determinar la prevalencia de aislados ExPEC en 2 grupos de aislados que se consideraron de relevancia, los que producían CTX-M-15, por su posible pertenencia al clon altamente virulento O25b:H4-ST131 y aquellos productores de SHV-12, por su alta prevalencia en nuestra zona. Como se esperaba, se observaron diferencias en el perfil de genes codificantes de los FV estudiados entre los aislados de origen clínico (más numerosos y más variados) y los de origen alimentario. Además se encontró una asociación positiva entre los que producían CTX-M-15 y el gen de virulencia *afa/draBC*, que, como se ha mostrado en trabajos posteriores, es característico del grupo clonal O25b-ST131 (178).

Cabe destacar, en nuestro estudio, la alta frecuencia del gen *iucD* entre los aislados estudiados (61,7% de los aislados clínicos y 47,4% de los de origen alimentario). En los aislados productores de CTX-M-15 fue significativamente más prevalente que en los que producían SHV-12, aunque esta diferencia puede explicarse por la presencia de aislados del clon O25b (178). Este gen, relacionado con la captación del hierro del medio, es prevalente en otras poblaciones de *E. coli* estudiadas. Blanco y cols. (178) encuentran prevalencias del 76,7%, 100%, 71,4% y 80% en aislados clínicos de Lugo productores de CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-32 y SHV-12, respectivamente. Cortés y cols. (253) detectaron la presencia de este gen en el 43,9% de los aislados de *E. coli* que recuperaron del suelo de granjas de pollos en

España. Por otra parte, el gen *tsh*, presente en el 19,3% de los aislados alimentarios y 8,5% de origen humano del presente estudio, ha sido descrito en un estudio de Graziani y cols. (254) asociado a aislados de origen aviar (30,1% aislados aviares frente al 2,4% de origen humano), aunque en este trabajo los aislados no eran productores de BLEE.

En las primeras investigaciones sobre la asociación entre resistencia y virulencia se encontraron diferencias al comparar la frecuencia de FV en función de la sensibilidad o resistencia a antimicrobianos como las quinolonas, portando los últimos, en general, menos FVs asociados clásicamente al estatus ExPEC, como la hemolisina (255, 256) y un menor potencial invasivo (257). Si bien este hecho se atribuyó a una pérdida de FV ligada a la adquisición de resistencia (256), otro estudio puso de manifiesto la conversión de aislados sensibles a fluorquinolonas a resistentes sin que ello conllevara una pérdida de la capacidad para producir hemolisina (255). Johnson y cols. (84), en un trabajo posterior realizado con *E. coli* de origen humano y animal, señalaron que el nivel de resistencia está asociado a cambios en la distribución filogenética y el perfil de virulencia, que difería entre ambos grupos de aislados, lo que pone de manifiesto la importancia del contexto ecológico. El mismo autor publicó los resultados en un modelo murino sobre el potencial virulento del clon ST131 (típicamente resistente a fluorquinolonas y otros antimicrobianos y derivado del grupo filogenético altamente virulento B2) y mostró que ni el estatus ST131 ni el fenotipo de resistencia a fluorquinolonas se asociaba a la virulencia de los aislados (258). En el caso de los productores de BLEE, encontramos trabajos que ligan diferentes BLEE a diferentes filogrupos, como SHV y TEM preferentemente en aislados del filogrupo B2, y CTX-M con el D2 (142) que tiende a tener menos FVs y más resistencia a quinolonas. Otros trabajos indican que las enzimas CTX-M son producidas preferentemente por aislados del filogrupo B2 (259,260). En nuestro caso fue más frecuente la presencia de SHV-12 en aislados del filogrupo A, CTX-M del grupo 1 en el B2 y CTX-M- grupo 9 en el B1. Una asociación similar ha sido descrita en España por Oteo y cols. tras analizar datos de 27 hospitales (175) Todos estos resultados reflejan la complejidad de este aspecto de la epidemiología de las infecciones por *E. coli*.

No obstante, otros factores no relacionados con las características patogénicas de los aislados podrían determinar la frecuencia de infección en humanos. En un trabajo reciente llevado a cabo en España se señala que factores como la administración previa de antimicrobianos o la predisposición del paciente pueden ser más determinantes que el perfil de virulencia de los aislados ESBLEC a la hora de

originar infecciones (229), no habiéndose encontrado una asociación contundente entre la presencia de los FV estudiados o los filogrupos, con la epidemiología, las características de los pacientes ni el origen de la bacteriemia.

Como se ha comentado, la coresistencia a otras familias de antimicrobianos mostrada por ECBLEE puede deberse a dos factores. Por un lado, a la captura de una plataforma estable en la que coexisten las BLEE y los determinantes de resistencia, o bien una asociación de ambos en los mismos elementos genéticos móviles. En segundo lugar, la diseminación de los mismos, favorecida por la presión de selección antibiótica. Uno de los casos más estudiados es el de la coresistencia de ECBLEE a quinolonas. En muchos trabajos publicados en la literatura científica uno de los factores de riesgo identificado para el desarrollo de infección por ECBLEE es la administración previa de quinolonas. Sin embargo existen estudios donde no se encuentra una correlación significativa entre el consumo de fluorquinolonas y las tasas de resistencia a ciprofloxacino (261, 262). Una posible explicación de este hecho, además de las diferencias metodológicas entre los estudios y de diferencias locales en los hábitos de prescripción, sería que la introducción de grupos clonales en la comunidad que previamente portaran genes de resistencia y su posterior dispersión tuviera más relevancia que los hábitos de prescripción antibiótica en la comunidad (263). Esta teoría explicaría, al menos en parte, los resultados encontrados en este trabajo respecto a la resistencia a quinolonas y tobramicina, más frecuente en aislados clínicos que en los de origen alimentario y que es una característica común de aislados del clon ST131 (110, 264), detectado únicamente en el primer grupo.

Una quinta parte de los aislados de origen alimentario y sólo el 9% de los aislados de origen clínico mostraron sensibilidad a todos los antimicrobianos estudiados. Los patrones de resistencia más frecuentemente mostrados en aislados clínicos y de origen alimentario tienen en común la resistencia a quinolonas. En aislados de origen alimentario el patrón más común fue el de resistencia a ácido nalidíxico (48,2%) seguido del de resistencia a este mismo antibiótico y además a ciprofloxacino (29,4%). En aislados de origen clínico, el patrón de resistencia más frecuente fue el de resistencia a ácido nalidíxico, ciprofloxacino y cotrimoxazol (29,5%), seguido del de resistencia a ácido nalidíxico y ciprofloxacino. Hay que señalar que en los aislados de origen alimentario no se realizaron pruebas de sensibilidad a cotrimoxazol, lo que puede explicar que se encontraran con mayor frecuencia aislados resistentes a 2 o más familias de antimicrobianos entre los de origen clínico (64,3% vs 9%).

En cuanto a la distribución de aislados por serogrupos, se observó que los aislados clínicos pertenecían con más frecuencia al serogrupo O25, lo que atribuimos a la presencia de aislados del clon ST131. El segundo serogrupo en frecuencia, el O15, relacionado clásicamente con cepas virulentas de origen aviar (265, 266) ha sido identificado en aislados tanto de origen clínico como alimentario, siendo más frecuente en los últimos.

En resumen, las características comunes de los aislados clínicos y los de origen alimentario de este estudio fueron la expresión de BLEE de los 3 grupos principales, destacando en ambos una alta prevalencia de SHV-12, un nivel de resistencia a quinolonas elevado y una frecuente distribución en filogrupos comensales, especialmente el A.

6.4 Comparación con los resultados de animales de producción (sanos, enfermos y suelos de granja)

Otra forma de conocer la prevalencia de ECBLEE en animales estabulados es estudiar los suelos de las granjas. En los últimos años, es frecuente la descripción de enterobacterias resistentes en animales de producción, tanto sanos como enfermos, así como en el medio que les rodea. Briñas y cols. encontraron una prevalencia de ECBLEE del 2,2% entre animales enfermos (la mayoría provenientes de cerdos y pollos) (108). Mesa y cols. describieron prevalencias de portadores de ECBLEE del 100%, 80% y 20% en las granjas de pollos, cerdos y conejos (136). Las BLEE mayoritarias en ambos estudios son las habituales en infecciones humanas, CTX-M-14, SHV-12 y CTX-M-1 (135). Incluso se encuentran casos de diseminación clonal, como en el estudio de Bortolaia y cols (267), donde encontraron en granjas italianas aviares 3 clones productores de SHV-12 que constituían el 64% de los aislados.

Otros trabajos analizan también la distribución por filogrupos de los aislados que colonizan el intestino animal y, en general, es frecuente la presencia de aislados de los mismos filogrupos encontrados en muestras cárnicas y en aislados de infecciones humanas. Cortés y cols., analizan granjas de pollo y cerdos del norte de España (muestras fecales de animales sanos). En *E. coli* de origen aviar los grupos filogenéticos predominantes fueron el A (23%), B1 (39%) y D (32%), encontrándose una escasa presencia de aislados del filogrupo B2. En granjas de cerdos, fueron aún más prevalentes los aislados de los filogrupos A (55%) y B1 (35%), cifras ambas muy similares a las obtenidas en el análisis de nuestras muestras cárnicas (253).

En un trabajo reciente, Giufre y cols. (268) comparan 277 aislados de *E. coli* de origen humano con 101 aislados recuperados de heces de aves en Italia. Aunque evidencian una diferencia en la distribución por filogrupos entre ambos grupos de aislados, con los del filogrupo B2 predominando en aislados de origen humano (más del 50%) y A (35%) y B1 (30%) en los de origen animal, cuando se estratifican los aislados en función de la resistencia o sensibilidad a ciprofloxacino encuentran un representación mayor de los aislados humanos del filogrupo A entre los resistentes. Además, describen una alta representación de aislados pertenecientes a los complejos clonales (STs que difieren en un solo alelo) CC10 y CC23 entre aislados del filogrupo A de origen humano (92%) y aviar (71%). Estos complejos clonales son frecuentes también entre aislados humanos en España pertenecientes al filogrupo A (269). Estos datos sustentan la hipótesis inicial de este trabajo, de que al menos una parte de los aislados que causan infecciones en humanos tengan relación con los de origen animal.

La descripción de casos de infección y colonización por ECBLEE en animales de compañía ha ido aumentando en paralelo con las descripciones realizadas en casos clínicos humanos. En China se han comunicado cifras de prevalencia del 25% en mascotas sanas (perros y gatos) y 55% en enfermos (270). En animales salvajes (generalmente en heces) y en el entorno de los mismos también son frecuentes. En Portugal se ha detectado la presencia de *E. coli* productor de CTX-M-1 en jabalíes (271), CTX-M-14,-1 y SHV-12 en aves rapaces, CTX-M-14 en zorros, CTX-M-14,-1 y -32 y TEM-52 en gaviotas (272) y TEM-52 en ciervos y lechuzas (134).

Otra posible fuente de contaminación de animales y alimentos es la contaminación del agua. Aunque desde los años 50 del siglo XX está prohibido efectuar el riego de frutas y hortalizas con aguas residuales, existe la posibilidad de contaminación de aguas profundas y de superficie con vertidos de aguas residuales. Las aguas residuales y urbanas han sido objeto de estudio en diversas ocasiones. En China se ha descrito contaminación del sedimento de un río urbano con ECBLEE (273) y en Australia de aguas residuales (274). Incluso se ha comunicado la presencia de ECBLEE en aguas urbanas después de ser sometida a tratamiento secundario. En un estudio realizado en Cataluña (136) se analizaron 5 muestras de agua y en las 5 se detectó la presencia de ECBLEE. En otro trabajo en Irlanda (275) se aisló ECBLEE en aguas residuales, siendo el 77% del grupo CTX-M-1 y 23% del grupo CTX-M-9. Ambos grupos son BLEE de importancia clínica en ese país, con una prevalencia conjunta en torno al 50% (226).

6.5 Vías de transferencia de BLEE entre alimentos y humanos

Como se comentó anteriormente, el aumento en la prevalencia de ECBLEE puede deberse a dos factores, la diseminación de clones que porten plásmidos con estas BLEE y la transferencia de plásmidos o elementos genéticos móviles entre aislados no necesariamente clonales, también conocida como “transferencia horizontal”. La determinación del grupo de incompatibilidad plasmídico aporta información valiosa al estudio de la epidemiología de las BLEE, puesto que permite llevar a cabo estudios comparativos en diferentes localizaciones geográficas y entre diferentes especies bacterianas. Además de estas técnicas podemos utilizar el análisis de los entornos genéticos de las BLEE (transposones, integrones y secuencias de inserción) para obtener información epidemiológica relevante.

En nuestro estudio hemos detectado ambos fenómenos: una expansión clonal entre aislados clínicos y una transferencia horizontal entre aislados cárnicos y clínicos. Vamos a ver a continuación estas dos circunstancias con más detalle.

6.5.1 Diseminación clonal

Aunque *E. coli* no se caracteriza por presentar una alta frecuencia de diseminación clonal, se han descrito brotes causados por este microorganismo, como los causados por el clon O15:K52:H21 dentro y fuera de Europa (276-279) y por el denominado “grupo clonal A” en América del Norte (280). Como hemos comentado, en los últimos años hemos asistido a la emergencia y rápida diseminación de un exitoso clon denominado O25b:H4-ST131. La multirresistencia que muestra se debe por una parte a la adquisición de un plásmido que vehiculiza una única región determinante de multirresistencia (MDR) (222) y por otra a mutaciones cromosómicas que afectan a la actividad de fluorquinolonas. La MDR contiene múltiples transposones o fragmentos de los mismos, en los que varía el número de copias de IS26 y su posición, y los siguientes genes de resistencia: *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-1}, *tetA*, *aac(6′)-Ib-cr* y *aac(3)-II*. Adicionalmente, los aislados pertenecientes a este clon suelen poseer un mayor número de genes codificantes de factores de virulencia, entre los que se incluyen los codificantes de adhesinas *iha* y *fimH*, la toxina *sat*, los sideróforos *iutA/iucD*, el elemento capsular *kpsMII*, etc. (264). Todos los aislados del complejo ST131 y que son productores de CTX-M-15, se agrupan en torno a unos cuantos pulsotipos en cada país y, como hemos visto, su irrupción supone el desplazamiento de otros ECBLEE ya establecidos. Aunque fue en 2008 cuando se definieron las

características de este clon (109, 110), hoy sabemos que aislados pertenecientes al mismo estaban circulando al menos desde el año 2003 (7). Estudios posteriores han demostrado que aislados pertenecientes al ST131 no poseedores del gen *bla*_{CTX-M-15} eran causa frecuente de infecciones en humanos desde principios de la década pasada (279, 281). Como se observa en la tabla 52, numerosas publicaciones científicas han descrito la diseminación a nivel mundial de aislados pertenecientes al ST131.

Región o país	Año	Origen	Criterio de selección aislados	Nº aislados	% aislados ST131 (n)	% de aislados ST131 que producían BLEE	Referencia
Europa, Canadá, Oriente Medio	2000-2006	Colección	BLEE, CTX-M-15	43	42 (18)	100	(109)
Europa, Asia y Canadá	NE	Clínico y colección	BLEE, CTX-M-15	41	88 (36)	100	(110)
Mundial	2004-2006	Clínico	BLEE	84	19 (16)	100	(282)
Europa	2003-2006	Clínico	Resistencia a FQ	148	24 (35)	No especificado	(279)
Bélgica	2006-2007	Clínico	BLEE CTX-M-15	43	72 (31)	100	(283)
Croacia	2002-2005	Clínico	BLEE CTX-M-15	12	42 (5)	100	(284)
Francia	1994-2003	Colección	BLEE	128	6 (8)	100	(285)
Francia	2002-2003	Clínico	NO BLEE + FG B2	129	3 (4)	0	(285)
Francia	2005	Clínico	Cefalosporinas 3G	41	15 (6)	100	(286)
Francia	2006	Clínico	BLEE	48	21 (10)	100	(287)
Francia	2006-2007	Colección	BLEE	41	46 (19)	100	(285)
Francia	2006	Portadores	Ninguno	100	7 (7)	0	(288)
Irlanda	2003-2007	Clínico	BLEE	371	<10	100	(226)
Italia	2006	Clínico	Resistencia FQ + BLEE	18	61 (11)	100	(289)
Noruega	2003	Clínico	BLEE	45	20(9)	100	(290)
España	2004	Clínico	BLEE	91	9 (8)	100	(269)
España	2004-2007	Clínico	Amp-C	121	6 (7)	0	(291)
España	2006	Clínico	BLEE, CTX-M-15	37	86 (32)	100	(156)
España	2006-2007	Clínico	BLEE	105	22 (23)	100	(178)
Turquía	2004-2005	Clínico	BLEE	17	6 (1)	100	(223)
Turquía	2006	Colección	BLEE	10	20 (2)	100	(285)
Reino Unido	2003-2004	Clínico	BLEE	287	>65 (>188)	100	(292)
Reino Unido	2004-2005	Clínico	Resistencia Cefpodoxima	88	59 (52)	98	(293)
Reino Unido	2004-2007	Colección	BLEE	103	81 (84)	100	(285)
Canadá	2000-2007	Clínico	BLEE	67	31 (21)	100	(294)
Canadá	2002-2004	Clínico	Resistencia FQ o COTRIMOXAZOL	199	23 (46)	>2	(281)
India, Pakistán, Bangladesh	2004-2006	Portador	BLEE	31	61 (19)	100	(282)

Región o país	Año	Origen	Criterio de selección aislados	Nº aislados	% aislados ST131 (n)	% de aislados ST131 que producían BLEE	Referencia
Camboya	2004-2005	Clínica	BLEE	30	27 (8)	100	(285)
Japón	2002-2003	Colección	BLEE	142	19 (27)	100	(295)
Japón	2003-2007	Clínico	Resistencia FQ	128	>30 (>38)	No especificado	(296)
Korea	2006-2007	Clínico	Resistencia FQ	129	25 (32)	19	(297)
Korea	2005	Colección	Resistencia FQ	21	>33 (>7)	No Especificado	(296)

Tabla 52. Distribución y frecuencia del clon ST131 en humanos .NE: No especificado. FQ: Fluorquinolonas

En la actualidad se han descrito otros aislados pertenecientes a este clon productores de diferentes tipos de BLEE tanto de origen clínico humano como de origen animal. En Barcelona, con una prevalencia de aislados del clon del 32%, el 27% de las cepas del mismo producían SHV-12 (298), cifras similares a las descritas por Oteo y cols. en un estudio multicéntrico español (15% SHV-12, 3% CTX-M-9 y 1,5% CTX-M-14) (175). Se ha descrito la presencia de aislados productores de CTX-M-9 en el suelo de granjas aviares (299) y también en animales de compañía, en algunos casos relacionados clonalmente con aislados de origen humano (300).

Varios factores pueden haber contribuido a la diseminación de estas cepas: 1) la expansión de un serotipo nuevo, 2) la adquisición de una región MDR por parte de un clon ya predominante debido a sus características de patogenicidad o capacidad de diseminación o 3) la incorporación del gen *bla*_{CTX-M-15} en un clon resistente a quinolonas que le confiere una mayor ventaja selectiva.

En nuestro estudio se ha descrito por primera vez en nuestra área la presencia de un grupo clonal de ECBLEE ST131. Aunque en nuestro estudio no se detectó ST131 en alimentos si se han encontrado puntualmente aislados de este clon en productos cárnicos crudos. Mora y cols. (301) realizaron un estudio comparando 19 aislados de origen aviar (infecciones y muestras de carne) y 33 de infecciones humanas, todos ellos pertenecientes al clon O25:H4 ST131. Encontraron 4 grupos clonales integrados por aislados de origen humano y aviar y en uno de ellos se agruparon con más del 90% de similitud 10 aislados (7 aviares y 3 humano) productores la mayoría de CTX-M-9. Sin embargo, en nuestro trabajo hemos descrito la presencia del gen *bla*_{CTX-M-15} en 6 aislados relacionados clonalmente de *E. coli* de la misma zona geográfica, 3 de origen clínico y 2 de origen alimentario, pertenecientes al filogrupo A (habitualmente asociado con baja virulencia) y al clon ST410. Este clon pertenece al complejo 10 que es uno de los mayoritarios entre los aislados ECBLEE en nuestro país en 2009 (269).

Encontrar el mismo clon común en aislados asociados a infección en humanos y en muestras cárnicas, aunque en un número pequeño de casos, indica la estrecha relación entre ambos ecosistemas: la flora intestinal humana y la cadena alimentaria en una misma área. A pesar de analizar colecciones contemporáneas, no se trata de grupos en los que podemos establecer una relación de causa-efecto inmediata. No estamos estudiando las muestras de carne que hayan servido de alimento a unos pacientes concretos, como cuando se lleva a cabo en un estudio clásico de

toxoinfección alimentaria, sino que simplemente se puede intentar establecer una relación ecológica. Por ello, sería lógico esperar un número pequeño de clones comunes, ya que los pacientes pudieron haber ingerido alimentos procedentes de la misma granja o no.

En el análisis de los plásmidos de estos 6 aislados del clon, que se llevó a cabo para determinar si existían similitudes con los del clon ST131, el gen *bla*_{CTX-M-15} se transfirió conjuntamente con otros marcadores de resistencia en plásmidos del grupo de incompatibilidad IncF y se encontró localizado en el mismo fragmento de restricción, tal y como se había descrito en aislados del filogrupa B2 caracterizados en otros trabajos (109, 146). Como se muestra en la Figura 29 A, la secuencia de inserción IS26 se detectó interrumpiendo una *ISEcp1* aguas arriba del gen *bla*_{CTX-M-15}, estructura básica que ya había sido descrita en otros genes *bla*_{CTX-M} (148) pero que mostraba algunas diferencias con los distintos entornos caracterizados hasta el momento del estudio en cepas del clon epidémico ST131 productor de CTX-M-15 (Figura 29) (146, 222, 224). En el año 2011 se publicaron nuevas estructuras de los entornos de *bla*_{CTX-M-15} de cepas de *E. coli* aisladas de viajeros de Reino Unido que regresaban de diferentes países. Se describió un grupo de 22 aislados originarios de pacientes que regresaban de India y Turquía, que presentaban un entorno de *bla*_{CTX-M-15} cuya secuencia es idéntica a la descrita en el presente estudio (302). Diez de estos aislados pertenecían al filogrupa A, 4 al B1, 1 al B2 y 7 al D.

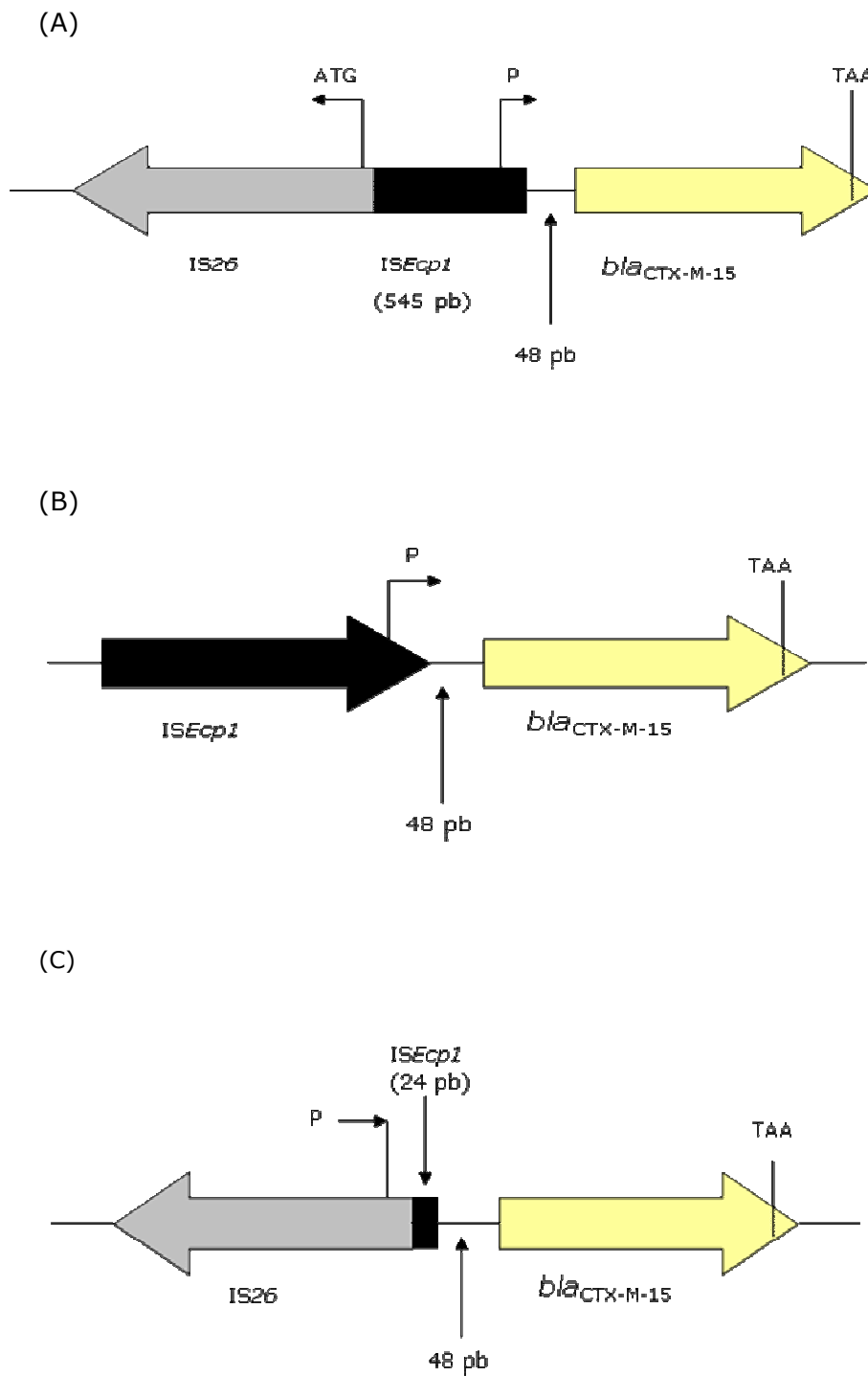


Figura 29. Representación esquemática del entorno genético del gen *bla*_{CTX-M-15} de los aislados de *E. coli* (A) pertenecientes al filogruppo A1 de este estudio, similar a la descrita por Dhanji y cols. en 2011, (B) pertenecientes al clon ST 131, filogruppo B2, más prevalente a nivel internacional (6) y (C) pertenecientes al clon más prevalente en Reino Unido, denominado "cepa A" (7). P: promotor habitual de *bla*_{CTX-M-15} localizado en *ISEcp1* en las figuras A y B. En la figura C se observa un promotor alternativo localizado en la IS26.

A diferencia del grupo clonal ST131, en el que todos los aislados pertenecían al mismo serotipo O25b:H4, los 6 aislados caracterizados en el presente trabajo se englobaron en 3 serotipos diferentes pero del mismo secuenciotipo (ST410), aunque todos presentaban el mismo antígeno flagelar, H9. Un fenómeno similar ha sido descrito en aislados de *E. coli* clonales pertenecientes al grupo filogenético D y al ST 69 (serotipos O17:H18, O15:H18, O17:HNM, O25:H18, O73:H18, O77/17:H18, ONT:H18 Y ONT:HNM) y el grupo filogenético B2, ST95 (O1:H7, O2:H7 y O18:H7) (303).

El hecho de que se hayan encontrado aislados de *E. coli* productores de CTX-M-15, no solo dentro del filogrupo B2 sino también en otros típicamente comensales como el filogrupo A1, pone de manifiesto que existen mecanismos adicionales a la dispersión clonal que están contribuyendo a la dispersión en nuestro área de este gen *bla* y otros genes de resistencia asociados, como es el caso de la transferencia horizontal de plásmidos IncF a cepas de *E. coli* de baja virulencia pertenecientes al filogrupo A1. Un clon predominante en humanos puede estar capturando plásmidos circulantes que vehiculizan CTX-M-15 a través de aislados de comportamiento comensal. Si estos plásmidos tienen un origen únicamente animal o humano es algo que no puede establecerse con los datos disponibles.

6.5.2 Diseminación horizontal: características de SHV-12

Los resultados del presente estudio ponen de manifiesto la importante prevalencia de SHV-12 en aislados de *E. coli* tanto clínicos como de origen alimentario. Las características epidemiológicas de las infecciones causadas por *E. coli* productor de SHV-12 no parecen diferir sustancialmente de las causadas por *E. coli* productor de enzimas CTX-M (105). Esta BLEE, que se describió por primera vez en Suiza en el año 1997 en aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* de origen clínico (38), es en la actualidad, tal y como se ha comentado, una BLEE ampliamente distribuida por todo el mundo, superando en frecuencia incluso a las BLEE del tipo CTX-M en algunos estudios locales (304) y es igualmente frecuente en animales de producción, (305, 306), en animales de compañía (132, 307) e incluso animales salvajes (134, 308).

En este trabajo se han analizado todos los plásmidos portadores de la BLEE más prevalente, SHV-12, que portaban los aislados del filogrupo mayoritario, A1. La gran mayoría pertenecían al grupo de incompatibilidad IncI1, tanto los de origen

alimentario como los de origen clínico, que además procedían principalmente de infecciones de la comunidad. Cuando se realizó el subtipado por pMLST de los plásmidos de este grupo de incompatibilidad, se determinó que la gran mayoría de estos plásmidos IncI1 pertenecían a los mismos secuenciotipos, ST3 y ST26 (ambos con representantes de origen clínico y alimentario).

Carattoli y cols., en una revisión publicada en 2011, señalan la alta prevalencia de plásmidos del grupo IncI1 (61%) entre los depositados en la base de datos de pMLST (309). Diversos autores han señalado una posible relación entre la familia plasmídica IncI1 y el entorno aviar. García-Fernández y cols. señalaron que la alta prevalencia de plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad IncI1 parece estar ligada a un reservorio de *E. coli* y *Salmonella* en aves (50). Girlich y cols. encontraron plásmidos de esta familia portadores del gen *bla*_{CTX-M-1} en *E. coli* procedente de heces de *broilers* en Francia (310). Poco tiempo después, García-Fernández y cols. caracterizaron por pMLST un grupo de 16 plásmidos de diversos orígenes entre los que se encontraban 3 de los plásmidos previamente estudiados por Girlich y cols. Encontraron que 2 de ellos pertenecían al mismo ST (ST3) y presentaban un patrón de RFLP similar a otro plásmido procedente de un aislado de una mascota en Italia. (50). En el mismo estudio, el único aislado productor de SHV-12 analizado, de origen aviar y procedente de Italia, pertenecía igualmente al ST3. Dos años más tarde, Cloackaert y cols. comunicaron la diseminación de plásmidos IncI1, ST3 en aislados de *Salmonella enterica* de origen aviar y humano en Francia (311). En 2011, Bortolaia y cols. caracterizaron 33 plásmidos de ECBLEE sin relación epidemiológica procedentes de aves de Italia y Dinamarca (312). Encontraron que 4 de 5 plásmidos IncI1 tipables pertenecían al ST3 (uno de ellos portando el *bla*_{SHV-12}) y el otro fue asignado al ST26 (igualmente portando el gen codificante de SHV-12). Otros plásmidos pertenecientes al ST26 han sido descritos *E. coli* y *Salmonella* de origen humano y animal (<http://pubmlst.org/plasmid/>).

Los resultados del análisis de los plásmidos IncI1 de este trabajo aportan información sobre la compleja epidemiología de ECBLEE y sugieren que plásmidos de esta familia están circulando en la actualidad entre *E. coli* de origen humano y alimentario, facilitando la dispersión de genes clínicamente relevantes. La transferencia horizontal juega un papel más importante que la transferencia vertical del mismo clon entre alimentos y seres humanos. Aunque no podemos afirmar que los aislados ECBLEE de productos cárnicos crudos tengan origen animal, puesto que podrían ser el resultado de la contaminación cruzada en diferentes puntos de la

cadena de producción, estos resultados refuerzan la hipótesis de que la cadena alimentaria esta implicada en la epidemiología de las ECBLEE y especialmente, en nuestro país, en la de *E. coli* productor de SHV-12.

6.6 Implicaciones epidemiológicas y para el control

En resumen, la rápida dispersión de ECBLEE en la comunidad es un fenómeno complejo, aún no bien comprendido. Diferentes reservorios y vías de transmisión pueden estar contribuyendo a este hecho. El hombre y los animales pueden actuar como reservorio de enterobacterias portadoras de BLEE. Tanto la transmisión animal-persona como persona-persona es posible y ha sido demostrada (251, 313, 314). Varios argumentos avalan el papel del reservorio en animales de producción en el aumento de infecciones por ECBLEE en humanos: 1) la transmisión de zoonosis por la misma vía, como es el caso de las infecciones causadas por *Salmonella*, y que estos enzimas se asocian a brotes por *Salmonella*, 2) la presión selectiva causada por el uso de antibióticos en el ganado y 3) las similitudes entre los determinantes hallados en aislados de animales y humanos.

Muchas investigaciones ponen de manifiesto que la administración de antimicrobianos favorece la selección, persistencia y diseminación de bacterias portadoras de genes de resistencia. Jorgensen y cols. (315) investigaron el posible impacto de la utilización de ceftiofur, cuyo uso terapéutico en ganado porcino y vacuno está permitido en Dinamarca, en la presencia de ECBLEE en cerdos. Seleccionaron 10 granjas en las que se usaba ceftiofur y 10 en las que no se había usado en los 6 meses anteriores al estudio. Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la utilización de ceftiofur y la presencia en heces de *E. coli* con sensibilidad disminuida a cefotaxima originada por la producción de CTX-M-1 o AmpC. No se detectaron aislados productores de CTX-M-1 en granjas donde no se utilizaba ceftiofur. De igual manera, en Dinamarca se llevó a cabo un seguimiento tras un cese voluntario de la administración de cefalosporinas en explotaciones porcinas, observándose una disminución significativa de la colonización por ECBLEE de los animales en granjas y mataderos (316).

Los antimicrobianos utilizados en producción animal pertenecen en muchos casos a las mismas familias y/o clases que los utilizados en humanos. En los actuales sistemas de producción animal se han administrado durante largos periodos de tiempo grandes cantidades de antimicrobianos con diferentes finalidades, como son:

1) terapéutico, para tratar animales enfermos; 2) control, para evitar la diseminación de una enfermedad en un grupo con animales sanos y enfermos; 3) prevención/profilaxis, para tratar animales expuestos a una enfermedad que aún no se ha declarado en el grupo; 4) promotor de crecimiento, utilizando el antibiótico como aditivo en la comida o bebida usualmente, para favorecer un crecimiento más rápido y mayor. En la actualidad, y aunque la tendencia general es hacia la disminución del uso de antimicrobianos en esta industria, la administración de antimicrobianos con fines terapéuticos y profilácticos constituye una práctica generalizada. Respecto a las legislaciones vigentes sobre la administración de antimicrobianos en veterinaria, en Europa los diferentes países establecen su propia normativa adaptándola de las recomendaciones de la agencia de seguridad alimentaria europea (EFSA). En América es la FDA (Food and Drug Administration) la encargada de legislar al respecto.

La EFSA publicó en 2011 un documento (305) en el que se reconoce que la industria del pollo y derivados es la más afectada por ECBLEE y que la cadena alimentaria puede actuar como vía de transmisión de genes *bla*, de los elementos genéticos móviles que los albergan y de clones bacterianos. Como medidas de control, el panel de expertos recomienda: i) reducir el uso de antimicrobianos en general, y especialmente el de cefalosporinas de 3ª y 4ª generación, en la industria animal; ii) aumentar el control sobre el comercio de animales dentro de UE y iii) mejorar las condiciones higiénicas a lo largo de todos los procesos que forman parte de la cadena alimentaria. En relación con el último punto, los expertos hacen mención especial a la necesidad de prevenir la transmisión vertical y la recirculación de bacterias productoras de BLEE específicamente en la industria de productos aviares destinados al consumo humano.

En España las penicilinas se encuentran entre los betalactámicos más utilizados en veterinaria y están aprobadas con fines terapéuticos para todas las especies animales destinadas a producir alimentos humanos y también en animales de compañía. Sin embargo, las autorizaciones para el uso de cefalosporinas son más limitadas, sobre todo en animales de producción. El ceftiofur, comercializado bajo el nombre de Naxcel®, es una cefalosporina de tercera generación de uso exclusivo veterinario indicada para tratar infecciones respiratorias en ganado ovino, caprino, vacuno, equino y porcino. Esta cefalosporina se emplea también en algunos países de América para el tratamiento profiláctico de pollos de un día (317), pero en Europa está prohibido este uso. En Europa no está permitida la utilización de ninguna

cefalosporinas de 3ª o 4ª generación en aves de corral. Sin embargo si se utilizan en todas las especies ganaderas quinolonas como el enrofloxacin, aprobada para uso terapéutico en todos los animales y que suele administrarse en agua de bebida en aves. Finlandia y Dinamarca son los únicos países europeos que prohíben el uso de quinolonas en aves. A principios del año 2012 la FDA limitó el uso de ceftiofur, aunque sólo en ganado de gran consumo (vacuno, aviar y porcino), para tratar enfermedades específicamente autorizadas o aquellas no autorizadas siempre que se sigan las indicaciones de dosificación, ruta de administración y duración del tratamiento (<http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2012-01-06/pdf/2012-35.pdf>). Este organismo, que ya intentó limitar el uso de cefalosporinas en animales en 2008, cita, entre otros ejemplos, el decremento observado en la prevalencia de *Salmonella* Heidelberg resistente a cefalosporinas en carne de pollo y humanos en Canadá, tras la restricción voluntaria adoptada por los ganaderos (318). La nueva normativa es más permisiva que la inicialmente propuesta, que prohibía cualquier uso no autorizado de las cefalosporinas.

El cumplimiento de las normativas y/o recomendaciones anteriormente expuestas no es estricto y el uso fuera de las indicaciones aprobadas de estos medicamentos es frecuente. En el caso de ceftiofur, por ejemplo, es conocido su uso en dosis mayores de las permitidas, por vías de administración no autorizadas (como inyección en huevos) y para usos diferentes de los legalmente establecidos (<http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2008-07-03/html/E8-15052.htm>) (305, 318). Por otro lado, la comercialización de productos alimenticios cárnicos o sus derivados a nivel mundial supone otro problema para el control de la dispersión de bacterias resistentes en países con legislaciones estrictas respecto a la administración de antimicrobianos.

Para un mejor control del uso de antimicrobianos en la industria animal son indispensables los estudios de vigilancia de venta y consumo de los mismos, así como conocer la finalidad y la manera en que son administrados. Sin embargo, a día de hoy es complicado estimar estos parámetros. El hecho de que un mismo antimicrobiano pueda administrarse en diferentes especies animales es un inconveniente para interpretar el uso respecto al tamaño de las poblaciones animales tratadas. Las variaciones en los patrones de uso entre países (50% de betalactámicos en países como Finlandia y 1% en Dinamarca o Francia), diferencias en el manejo del ganado, dosificaciones, prescripción, disponibilidad de los medicamentos y la escasez de datos fiables sobre el volumen de producción y

exportación animal hacen difícil llevar a cabo estas labores de seguimiento y control (319). Por otra parte, la restricción en la producción animal de una familia de antibióticos, como las cefalosporinas de 3-4ª generación, no necesariamente disminuye la presión selectiva de genes codificantes de BLEE, ya que muchas de las plataformas genéticas que han capturado estos genes codifican también genes de resistencia a otras familias de antibióticos y también a metales pesados. El fenómeno de la co-selección en producción animal debería ser tenido en cuenta en estudios posteriores que analicen el papel del cobre y otros metales como el zinc utilizados como profilaxis en animales (320).

Según el documento "La alimentación en España 2007" elaborado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, la carne de pollo fue la más consumida en este año, con 564.323 millones de Kg, que suponían un 33% del total. Esta cifra corresponde a un consumo de carne fresca de pollo per cápita de 12.77 Kg. Si tenemos en cuenta el consumo en restauración, esta cifra se eleva hasta los 16 Kg de carne de pollo fresca per cápita. Tal y como se muestra en la figura 30, para poder calcular el riesgo de exposición del consumidor a ECBLEE de origen cárnico habría que tener en cuenta la probabilidad con la que se dan diversos factores. Un trabajo realizado en Bélgica recientemente desarrolla un modelo para hacer esta estimación, encontrando que la probabilidad de exposición a ≥ 1000 UFC de ECBLEE/*E. coli* AmpC al consumir carne de pollo es baja, cercana al 1.5% y deriva mayoritariamente de la contaminación cruzada en la cocina (8).

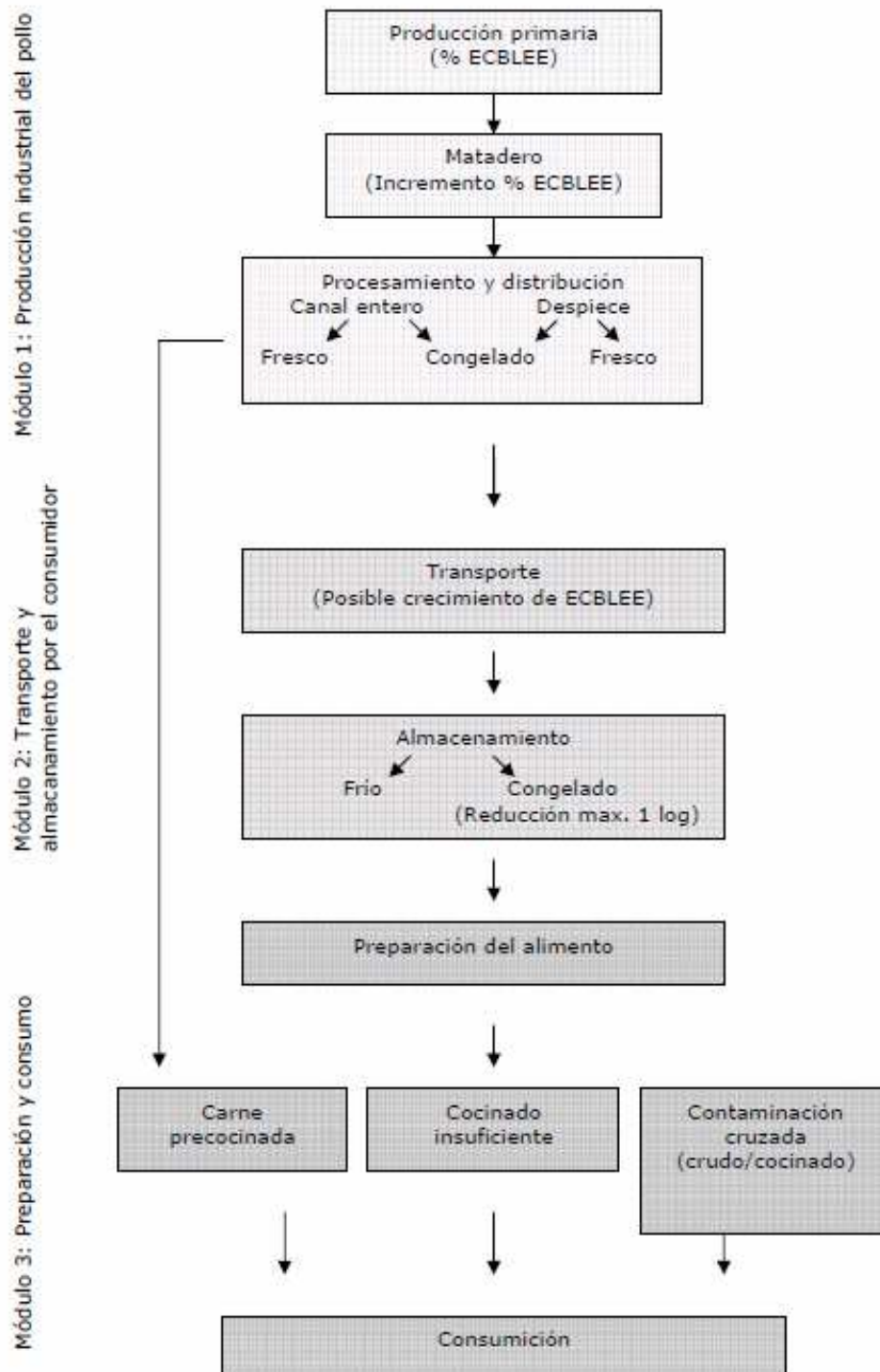


Figura 30. Factores que determinan el riesgo de ingestión de ECBLEE a partir de alimentos cárnicos aviares. Adaptado de Depoorter y cols., 2012 (8)

Por último, hay que señalar que existen varios posibles orígenes y vías de transmisión de ECBLEE adicionales a las ligadas a la cadena alimentaria pero relacionadas entre sí (Figura 31).

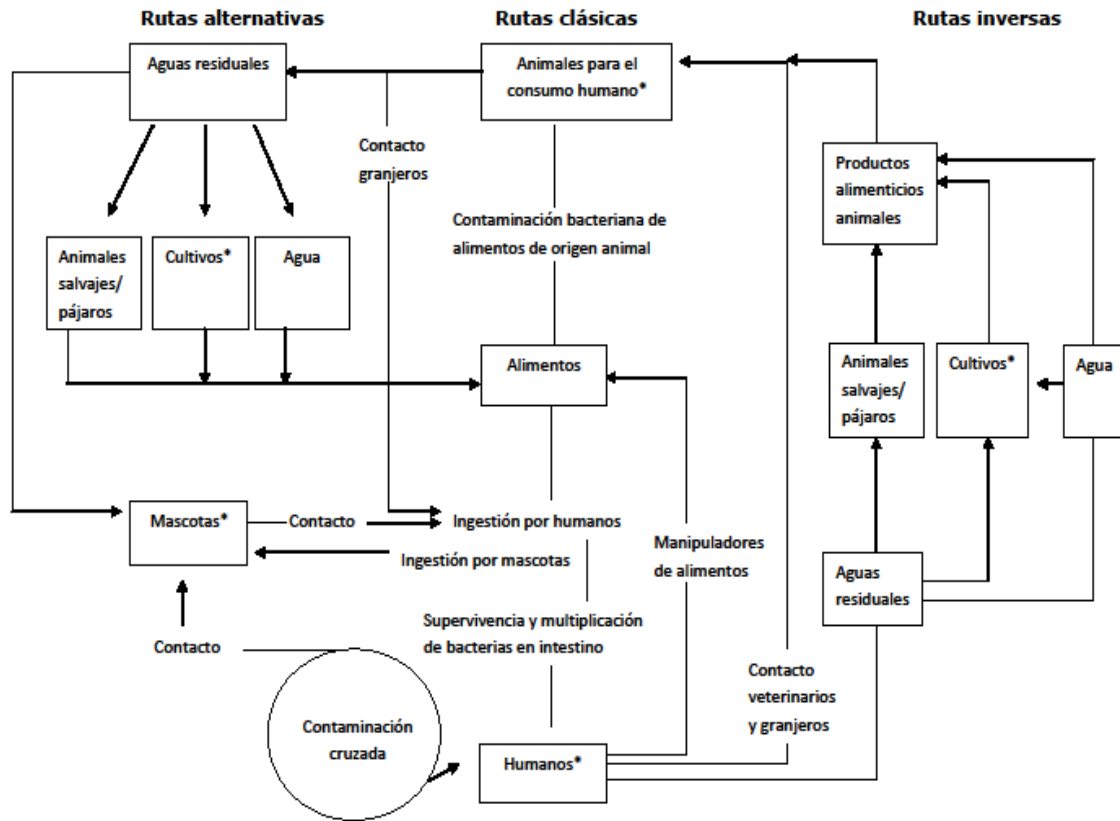


Figura 31. Posibles rutas de transmisión de enterobacterias patógenas y comensales entre animales y humanos. *Uso de antimicrobianos. Tomado de Phillips y cols., 2004 (9)

El estudio de las rutas de transmisión se hace imprescindible para determinar la magnitud y direccionalidad del flujo de dispersión de este microorganismo. Para ello es necesario aplicar protocolos estrictos en áreas geográficas definidas, que analicen conjuntamente poblaciones bacterianas de origen humano y animal y los elementos genéticos móviles que portan, así como un registro detallado del uso de antimicrobianos en ambos entornos. Los microorganismos están presentes en nichos ecológicos variados, como el animal, humano, el suelo, el agua, etc. Entre estos nichos, que se analizan habitualmente de forma individual, existe un intercambio de microorganismos, entre animales y humanos, al medioambiente (al suelo, agua, etc.) y de nuevo al hombre y a los animales, tanto de producción como salvajes o mascotas, a través del medio o de los alimentos de origen animal o vegetal

(colonizados por bacterias de origen animal, por la manipulación del hombre, por la contaminación del medio, etc.). El empleo de antimicrobianos en cada nicho puede seleccionar los microorganismos resistentes y convertir estos reservorios bacterianos en reservorios de genes de resistencia que se diseminan fácilmente. Es más, la adquisición de nuevos elementos genéticos móviles puede capacitar a un microorganismo para colonizar nuevos nichos. Una vez que la bacteria coloniza productos alimenticios, como la carne o los vegetales, un inadecuado procesamiento de los mismos antes de ingerirlos (carne mal cocinada o vegetales que se consumen crudos) puede ocasionar la entrada y colonización del intestino humano y posteriormente ocasionar infecciones por ECBLEE, con limitadas alternativas terapéuticas. Aunque la contribución del reservorio animal es difícil de cuantificar, la restricción en el uso de antimicrobianos en producción animal es prioritaria para reducir los riesgos de dispersión de microorganismos y de los elementos genéticos portadores de genes de resistencia y preservar la eficacia de los mismos en el tratamiento de infecciones en humanos.

Conclusiones

7. CONCLUSIONES

1. Se ha encontrado colonización por ECBLEE en todos los tipos de productos cárnicos frescos analizados, siendo más frecuente en los productos de origen aviar (pollo y pavo), con un 70% de muestras positivas. Las muestras colonizadas procedían mayoritariamente de establecimientos de tipo mercado.
2. No se observó colonización por ECBLEE en alimentos cárnicos cocinados, alimentos procesados para mascotas, ni en la superficie de los huevos. En cambio, se detectó contaminación cruzada de alimentos vegetales que se consumen frescos, pero en muy bajo grado, suponiendo sólo el 3% de las muestras de este origen analizadas.
3. La prevalencia de aislados ECBLEE en infecciones clínicas en nuestro medio durante el periodo de estudio fue del 3%. Esta cifra es similar a la detectada en estudios nacionales multicéntricos realizados previamente.
4. SHV-12 fue la BLEE más prevalente en aislados de origen clínico y alimentario. En ambos grupos de aislados se detectaron BLEE de los tres grandes grupos circulantes en la actualidad, CTX-M-1, CTX-M-9 y SHV, aunque con frecuencias variables. La mayoría de aislados de origen alimentario eran productores de SHV-12, mientras que entre los de origen clínico no se observó ningún grupo predominante.
5. Se observaron diferencias en la distribución de ECBLEE de origen clínico y alimentario por filogrupos. Los filogrupos típicamente comensales A y B1 estaban ampliamente representados en ambos grupos de aislados, aunque los de origen alimentario pertenecían con más frecuencia que los clínicos al filogrupo A1 y la mayoría de los integrantes del filogrupo patógeno B2 eran de origen clínico.
6. Los aislados de origen clínico mostraron con mayor frecuencia resistencia a ciprofloxacino y tobramicina. Esta diferencia se asocia a la presencia del clon ST131 que se detectó exclusivamente entre aislados clínicos y por primera vez en nuestra área. Este clon se caracteriza en nuestro estudio por la producción de CTX-M-15, resistencia a tobramicina y a quinolonas.

7. Se han detectado clones integrados por ECBLEE de origen clínico y alimentario pertenecientes al filogrupo A, lo que apunta a una transferencia horizontal de aislados entre la cadena alimentaria y la flora intestinal de los pacientes de nuestra área o una posible exposición a una fuente común.
8. Los plásmidos mayoritarios en los aislados clínicos y de origen alimentario de este estudio, que son los que vehiculizan SHV-12, corresponden al mismo grupo de incompatibilidad y subtipos. Este hecho indica que están estrechamente relacionados y existe la posibilidad de que se esté produciendo una transferencia horizontal de este tipo de plásmidos entre aislados que colonizan alimentos cárnicos y aislados que producen infecciones humanas.
9. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que la cadena alimentaria puede actuar de reservorio de BLEE, principalmente como fuente de plásmidos portadores de genes *bla*_{SHV-12} y con menor frecuencia de aislados productores de BLEE. No obstante, el reservorio asociado a la ingesta y manipulación de alimentos cárnicos sólo explica una parte de la diseminación de BLEE, existiendo otros fenómenos como la introducción de un clon virulento productor de CTX-M-15 entre aislados clínicos no relacionados con la cadena alimentaria.
10. Dada la compleja epidemiología de las infecciones causadas por ECBLEE sería necesario llevar a cabo estudios de caracterización de estos microorganismos y de sus plásmidos en diferentes compartimentos para determinar la relación epidemiológica existente, determinar los puntos críticos que condicionan la intervención de la cadena alimentaria, profundizar en el conocimiento de las vías de diseminación entre los diferentes nichos así como la transmisión interhumana, todo ello con el objetivo de diseñar medidas de control.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology 9th edition. 9th ed.: ASM Press; 2007.
- (2) Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Jan;48(1):1-14.
- (3) Poirel L, Naas T, Nordmann P. Genetic support of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008 Jan;14 Suppl 1:75-81.
- (4) Sabate M, Navarro F, Miro E, Campoy S, Mirelis B, Barbe J, *et al.* Novel complex sul1-type integron in *Escherichia coli* carrying *bla*_{CTX-M-9}. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Aug;46(8):2656-2661.
- (5) Romero L, Lopez L, Rodriguez-Bano J, Ramon Hernandez J, Martinez-Martinez L, Pascual A. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2005 Aug;11(8):625-631.
- (6) Canton R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006 Oct;9(5):466-475.
- (7) Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, Turton J, Fagan EJ, James D, *et al.* Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2004 Oct;54(4):735-743.
- (8) Depoorter P, Persoons D, Uyttendaele M, Butaye P, De Zutter L, Dierick K, *et al.* Assessment of human exposure to 3rd generation cephalosporin resistant *E. coli* (CREC) through consumption of broiler meat in Belgium. *Int J Food Microbiol* 2012 Sep 17;159(1):30-38.
- (9) Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, *et al.* Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother* 2004 Jan;53(1):28-52.
- (10) Mychajlonka M, McDowell TD, Shockman GD. Inhibition of peptidoglycan, ribonucleic acid, and protein synthesis in tolerant strains of *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1980 Apr;17(4):572-582.
- (11) Ghuysen JM. Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol* 1991;45:37-67.
- (12) Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis* 1988 Jul-Aug;10(4):677-678.

- (13) Richmond MH, Sykes RB. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol* 1973;9:31-88.
- (14) Sykes RB, Matthew M. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1976 Jun;2(2):115-157.
- (15) Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980 May 16;289(1036):321-331.
- (16) Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989 Mar;33(3):259-263.
- (17) Bush K. Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. *Antimicrob Agents Chemother* 1989 Mar;33(3):264-270.
- (18) Bush K. Classification of beta-lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. *Antimicrob Agents Chemother* 1989 Mar;33(3):271-276.
- (19) Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 Jun;39(6):1211-1233.
- (20) Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Rev Infect Dis* 1988 Jul-Aug;10(4):879-884.
- (21) Matagne A, Lamotte-Brasseur J, Frere JM. Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity. *Biochem J* 1998 Mar 1;330 (Pt 2)(Pt 2):581-598.
- (22) Knox JR. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 Dec;39(12):2593-2601.
- (23) Bertrand X, Hocquet D, Boisson K, Siebor E, Plesiat P, Talon D. Molecular epidemiology of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamase in a French university-affiliated hospital. *Int J Antimicrob Agents* 2003 Aug;22(2):128-133.
- (24) De Champs C, Chanal C, Sirot D, Baraduc R, Romaszko JP, Bonnet R, *et al.* Frequency and diversity of Class A extended-spectrum beta-lactamases in hospitals of the Auvergne, France: a 2 year prospective study. *J Antimicrob Chemother* 2004 Sep;54(3):634-639.
- (25) Perilli M, Dell'Amico E, Segatore B, de Massis MR, Bianchi C, Luzzaro F, *et al.* Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from an Italian nationwide survey. *J Clin Microbiol* 2002 Feb;40(2):611-614.

-
- (26) Salso S, Culebras E, Andrade R, Picazo JJ. Outbreak of TEM-24-producing *Enterobacter aerogenes* in a Spanish hospital. *Microb Drug Resist* 2003 Fall;9(3):299-305.
- (27) Chaibi EB, Sirot D, Paul G, Labia R. Inhibitor-resistant TEM beta-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J Antimicrob Chemother* 1999 Apr;43(4):447-458.
- (28) Robin F, Delmas J, Schweitzer C, Tournilhac O, Lesens O, Chanal C, *et al.* Evolution of TEM-type enzymes: biochemical and genetic characterization of two new complex mutant TEM enzymes, TEM-151 and TEM-152, from a single patient. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 Apr;51(4):1304-1309.
- (29) Fernandez-Rodriguez A, Reguera JA, Perez-Diaz JC, Picazo JJ, Baquero F. 1st Spanish epidemic of plasmid resistance to 3d generation cephalosporins: the implication of SHV-2. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1992 Oct;10(8):456-461.
- (30) Gutmann L, Ferre B, Goldstein FW, Rizk N, Pinto-Schuster E, Acar JF, *et al.* SHV-5, a novel SHV-type beta-lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins and monobactams. *Antimicrob Agents Chemother* 1989 Jun;33(6):951-956.
- (31) Brinas L, Lantero M, Zarazaga M, Perez F, Torres C. Outbreak of SHV-5 beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal-pediatric intensive care unit in Spain. *Microb Drug Resist* 2004 Winter;10(4):354-358.
- (32) Espinosa de los Monteros LE, Silva-Sanchez J, Jimenez LV, Rojas T, Garza-Ramos U, Valverde V. Outbreak of infection by extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing *Serratia marcescens* in a Mexican hospital. *J Chemother* 2008 Oct;20(5):586-592.
- (33) Naas T, Namdari F, Reglier-Poupet H, Poyart C, Nordmann P. Panresistant extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing *Acinetobacter baumannii* from New York City. *J Antimicrob Chemother* 2007 Nov;60(5):1174-1176.
- (34) Poirel L, Lebessi E, Castro M, Fevre C, Foustoukou M, Nordmann P. Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Jun;48(6):2277-2279.
- (35) Bedenic B, Schmidt H, Herold S, Monaco M, Plecko V, Kalenic S, *et al.* Epidemic and endemic spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 beta-lactamase in Dubrava University Hospital, Zagreb, Croatia. *J Chemother* 2005 Aug;17(4):367-375.
-

- (36) Subramaniam G, Palasubramaniam S, Navaratnam P. SHV-5 extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* in Malaysia. *Indian J Med Microbiol* 2006 Jul;24(3):205-207.
- (37) Uzunovic-Kamberovic S, Bedenic B, Vranes J. Predominance of SHV-5 beta-lactamase in enteric bacteria causing community-acquired urinary tract infections in Bosnia and Herzegovina. *Clin Microbiol Infect* 2007 Aug;13(8):820-823.
- (38) Nuesch-Inderbinen MT, Kayser FH, Hachler H. Survey and molecular genetics of SHV beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob Agents Chemother* 1997 May;41(5):943-949.
- (39) Olson AB, Silverman M, Boyd DA, McGeer A, Willey BM, Pong-Porter V, *et al.* Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 May;49(5):2112-2115.
- (40) Saladin M, Cao VT, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ould-Hocine Z, *et al.* Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett* 2002 Apr 9;209(2):161-168.
- (41) Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Xiong JH, Hawkey PM. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among *Enterobacteriaceae* in the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Mar;46(3):630-637.
- (42) Bonnet R, Dutour C, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, Labia R, *et al.* Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-->Gly. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 Aug;45(8):2269-2275.
- (43) Sabate M, Tarrago R, Navarro F, Miro E, Verges C, Barbe J, *et al.* 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 Jul;44(7):1970-1973.
- (44) Bure A, Legrand P, Arlet G, Jarlier V, Paul G, Philippon A. Dissemination in five French hospitals of *Klebsiella pneumoniae* serotype K25 harbouring a new transferable enzymatic resistance to third generation cephalosporins and aztreonam. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988 Dec;7(6):780-782.
- (45) Pena C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Linares J, *et al.* Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae*

- producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1998 Jan;42(1):53-58.
- (46) Brun-Buisson C, Legrand P, Philippon A, Montravers F, Ansquer M, Duval J. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* 1987 Aug 8;2(8554):302-306.
- (47) Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 Jun;53(6):2227-2238.
- (48) Antunes P, Coque TM, Peixe L. Emergence of an IncIgamma plasmid encoding CMY-2 beta-lactamase associated with the international ST19 OXA-30-producing beta-lactamase *Salmonella Typhimurium* multidrug-resistant clone. *J Antimicrob Chemother* 2010 Oct;65(10):2097-2100.
- (49) Villa L, Garcia-Fernandez A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother* 2010 Dec;65(12):2518-2529.
- (50) Garcia-Fernandez A, Chiaretto G, Bertini A, Villa L, Fortini D, Ricci A, et al. Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother* 2008 Jun;61(6):1229-1233.
- (51) Ford PJ, Avison MB. Evolutionary mapping of the SHV beta-lactamase and evidence for two separate IS26-dependent *bla*_{SHV} mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. *J Antimicrob Chemother* 2004 Jul;54(1):69-75.
- (52) Poirel L, Lartigue MF, Decousser JW, Nordmann P. *ISEcp1B*-mediated transposition of *bla*_{CTX-M} in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Jan;49(1):447-450.
- (53) Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988 Jul-Aug;10(4):867-878.
- (54) Tzelepi E, Giakkoupi P, Sofianou D, Loukova V, Kemeroglou A, Tsakris A. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol* 2000 Feb;38(2):542-546.
- (55) Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement.

- CLSI document M100-S19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009. 2009;29.
- (56) Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. Clin Microbiol Infect 2008 Jan;14 Suppl 1:90-103.
- (57) Pfaller MA, Segreti J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases. Clin Infect Dis 2006 Apr 15;42 Suppl 4:S153-63.
- (58) Queenan AM, Foleno B, Gownley C, Wira E, Bush K. Effects of inoculum and beta-lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. J Clin Microbiol 2004 Jan;42(1):269-275.
- (59) Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001 Oct;14(4):933-51, table of contents.
- (60) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Expert Rules in antimicrobial susceptibility testing. Version 1. EUCAST, 2008. .
- (61) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Expert Rules in antimicrobial susceptibility testing. Version 1.1. EUCAST, 2010. .
- (62) Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
- (63) Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
- (64) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.3. EUCAST, 2011. .
- (65) Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended-spectrum beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1989 Aug;33(8):1131-1136.
- (66) Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1985 Aug;28(2):302-307.
- (67) Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A, *et al.* Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates

- of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. J Antimicrob Chemother 1987 Sep;20(3):323-334.
- (68) Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1988 Aug;32(8):1243-1246.
- (69) Bauernfeind A, Casellas JM, Goldberg M, Holley M, Jungwirth R, Mangold P, et al. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. Infection 1992 May-Jun;20(3):158-163.
- (70) 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 Feb;40(2):509-513.
- (71) Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, Imajo S, Ishiguro M, Matsuzawa H. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1995 Oct;39(10):2269-2275.
- (72) Simarro E, Navarro F, Ruiz J, Miro E, Gomez J, Mirelis B. *Salmonella enterica* serovar virchow with CTX-M-like beta-lactamase in Spain. J Clin Microbiol 2000 Dec;38(12):4676-4678.
- (73) Oliver A, Perez-Diaz JC, Coque TM, Baquero F, Canton R. Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. Antimicrob Agents Chemother 2001 Feb;45(2):616-620.
- (74) Canton R, Oliver A, Coque TM, Varela Mdel C, Perez-Diaz JC, Baquero F. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. J Clin Microbiol 2002 Apr;40(4):1237-1243.
- (75) Coque TM, Oliver A, Perez-Diaz JC, Baquero F, Canton R. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). Antimicrob Agents Chemother 2002 Feb;46(2):500-510.
- (76) Valverde A, Coque TM, Sanchez-Moreno MP, Rollan A, Baquero F, Canton R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. J Clin Microbiol 2004 Oct;42(10):4769-4775.

- (77) 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 Nov;172(11):6175-6181.
- (78) Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl Environ Microbiol 2000 Oct;66(10):4555-4558.
- (79) Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, et al. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. Infect Immun 1999 Feb;67(2):546-553.
- (80) Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. J Infect Dis 2000 May;181(5):1753-1754.
- (81) Johnson JR, Delavari P, Kuskowski M, Stell AL. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. J Infect Dis 2001 Jan 1;183(1):78-88.
- (82) Moulin-Schouleur M, Schouler C, Tailliez P, Kao MR, Bree A, Germon P, et al. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. J Clin Microbiol 2006 Oct;44(10):3484-3492.
- (83) Mokady D, Gophna U, Ron EZ. Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol 2005 Jan;43(1):66-73.
- (84) Johnson JR, Kuskowski MA, Owens K, Gajewski A, Winokur PL. Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among *Escherichia coli* isolates from animals and humans. J Infect Dis 2003 Sep 1;188(5):759-768.
- (85) Moreno E, Prats G, Sabate M, Perez T, Johnson JR, Andreu A. Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother 2006 Feb;57(2):204-211.
- (86) Johnson JR, van der Schee C, Kuskowski MA, Goessens W, van Belkum A. Phylogenetic background and virulence profiles of fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* isolates from the Netherlands. J Infect Dis 2002 Dec 15;186(12):1852-1856.
- (87) Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing

-
- Enterobacteriaceae* in Europe. Clin Microbiol Infect 2008 Jan;14 Suppl 1:144-153.
- (88) Pitout JD, Church DL, Gregson DB, Chow BL, McCracken M, Mulvey MR, *et al.* Molecular epidemiology of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the Calgary Health Region: emergence of CTX-M-15-producing isolates. Antimicrob Agents Chemother 2007 Apr;51(4):1281-1286.
- (89) Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P. Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. Antimicrob Agents Chemother 2008 Aug;52(8):2818-2824.
- (90) Goyal A, Prasad KN, Prasad A, Gupta S, Ghoshal U, Ayyagari A. Extended spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* & associated risk factors. Indian J Med Res 2009 Jun;129(6):695-700.
- (91) Lewis JS, 2nd, Herrera M, Wickes B, Patterson JE, Jorgensen JH. First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. Antimicrob Agents Chemother 2007 Nov;51(11):4015-4021.
- (92) Hernandez JR, Pascual A, Canton R, Martinez-Martinez L, Grupo de Estudio de Infeccion Hospitalaria. GEIH. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Spanish hospitals (GEIH-BLEE Project 2002). Enferm Infecc Microbiol Clin 2003 Feb;21(2):77-82.
- (93) Angel Diaz M, Ramon Hernandez J, Martinez-Martinez L, Rodriguez-Bano J, Pascual A, Grupo de Estudio de Infeccion Hospitalaria (GEIH). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Spanish hospitals: 2nd multicenter study (GEIH-BLEE project, 2006). Enferm Infecc Microbiol Clin 2009 Mar 27.
- (94) Ben-Ami R, Rodriguez-Bano J, Arslan H, Pitout JD, Quentin C, Calbo ES, *et al.* A multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in nonhospitalized patients. Clin Infect Dis 2009 Sep 1;49(5):682-690.
- (95) Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. Lancet Infect Dis 2008 Mar;8(3):159-166.
- (96) Warren RE, Harvey G, Carr R, Ward D, Doroshenko A. Control of infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms in hospitals and the community. Clin Microbiol Infect 2008 Jan;14 Suppl 1:124-133.
-

- (97) Cormican M, Morris D, Corbett-Feeney G, Flynn J. Extended spectrum beta-lactamase production and fluorquinolone resistance in pathogens associated with community acquired urinary tract infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998 Dec;32(4):317-319.
- (98) Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, Martinez-Martinez L, Muniain MA, Perea EJ, *et al.* Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2004 Mar;42(3):1089-1094.
- (99) Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother* 2005 Jul;56(1):52-59.
- (100) Rodriguez-Bano J, Alcalá JC, Cisneros JM, Grill F, Oliver A, Horcajada JP, *et al.* Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Arch Intern Med* 2008 Sep 22;168(17):1897-1902.
- (101) Andreu A, Planells I, Grupo Cooperativo Espanol para el Estudio de la Sensibilidad Antimicrobiana de los Patogenos Urinario. Etiology of community-acquired lower urinary infections and antimicrobial resistance of *Escherichia coli*: a national surveillance study. *Med Clin (Barc)* 2008 Apr 12;130(13):481-486.
- (102) Mirelis B, Navarro F, Miro E, Mesa RJ, Coll P, Prats G. Community transmission of extended-spectrum beta-lactamase. *Emerg Infect Dis* 2003 Aug;9(8):1024-1025.
- (103) Castillo Garcia FJ, Seral Garcia C, Pardos De la Gandara M, Millan Lou MI, Pitart Ferre C. Prevalence of fecal carriage of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in hospitalized and ambulatory patients during two non-outbreak periods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007 Jan;26(1):77-78.
- (104) Rodriguez-Bano J, Lopez-Cerero L, Navarro MD, Diaz de Alba P, Pascual A. Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *J Antimicrob Chemother* 2008 Nov;62(5):1142-1149.
- (105) Rodriguez-Bano J, Alcalá J, Cisneros JM, Grill F, Oliver A, Horcajada JP, *et al.* *Escherichia coli* producing SHV-type extended-spectrum beta-lactamase is a significant cause of community-acquired infection. *J Antimicrob Chemother* 2009 Apr;63(4):781-784.
- (106) Mulvey MR, Bryce E, Boyd D, Ofner-Agostini M, Christianson S, Simor AE, *et al.* Ambler class A extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia*

-
- coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Apr;48(4):1204-1214.
- (107) Teshager T, Dominguez L, Moreno MA, Saenz Y, Torres C, Cardenosa S. Isolation of an SHV-12 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strain from a dog with recurrent urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 Dec;44(12):3483-3484.
- (108) Brinas L, Moreno MA, Teshager T, Saenz Y, Porrero MC, Dominguez L, *et al.* Monitoring and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Mar;49(3):1262-1264.
- (109) Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, *et al.* Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis* 2008 Feb;14(2):195-200.
- (110) Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Canica MM, *et al.* Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 2008 Feb;61(2):273-281.
- (111) Karim A, Poirel L, Nagarajan S, Nordmann P. Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence *ISEcp1*. *FEMS Microbiol Lett* 2001 Jul 24;201(2):237-241.
- (112) Rodriguez-Bano J, Picon E, Gijon P, Hernandez JR, Ruiz M, Pena C, *et al.* Community-onset bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: risk factors and prognosis. *Clin Infect Dis* 2010 Jan 1;50(1):40-48.
- (113) Colodner R, Rock W, Chazan B, Keller N, Guy N, Sakran W, *et al.* Risk factors for the development of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004 Mar;23(3):163-167.
- (114) Paterson DL. Recommendation for treatment of severe infections caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol Infect* 2000 Sep;6(9):460-463.
- (115) Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, Muniain MA, de Cueto M, Rios MJ, *et al.* Bacteremia due to extended-spectrum beta -lactamase-producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: a new clinical challenge. *Clin Infect Dis* 2006 Dec 1;43(11):1407-1414.
-

- (116) Schwaber MJ, Carmeli Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2007 Nov;60(5):913-920.
- (117) Thomson KS, Moland ES. Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 Dec;45(12):3548-3554.
- (118) Pitout JD. Multiresistant *Enterobacteriaceae*: new threat of an old problem. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008 Oct;6(5):657-669.
- (119) Schwaber MJ, Carmeli Y. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a potential threat. *JAMA* 2008 Dec 24;300(24):2911-2913.
- (120) Ben-Ami R, Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwartz D, Giladi M, Chmelnitsky I, *et al.* Influx of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* into the hospital. *Clin Infect Dis* 2006 Apr 1;42(7):925-934.
- (121) Brinas L, Moreno MA, Zarazaga M, Porrero C, Saenz Y, Garcia M, *et al.* Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 beta-lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrob Agents Chemother* 2003 Jun;47(6):2056-2058.
- (122) Meunier D, Jouy E, Lazizzera C, Kobisch M, Madec J. CTX-M-1- and CTX-M-15-type β -lactamases in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from food-producing animals in France. *Int J Antimicrob Agents* 2006 11;28(5):402-407.
- (123) Jensen LB, Hasman H, Agerso Y, Emborg HD, Aarestrup FM. First description of an oxyimino-cephalosporin-resistant, ESBL-carrying *Escherichia coli* isolated from meat sold in Denmark. *J Antimicrob Chemother* 2006 Apr;57(4):793-794.
- (124) Aarestrup FM, Hasman H, Agerso Y, Jensen LB, Harksen S, Svensmark B. First description of *bla*_{CTX-M-1}-carrying *Escherichia coli* isolates in Danish primary food production. *J Antimicrob Chemother* 2006 Jun;57(6):1258-1259.
- (125) Liebana E, Batchelor M, Hopkins KL, Clifton-Hadley FA, Teale CJ, Foster A, *et al.* Longitudinal farm study of extended-spectrum beta-lactamase-mediated resistance. *J Clin Microbiol* 2006 May;44(5):1630-1634.
- (126) Teale CJ, Barker L, Foster AP, Liebana E, Batchelor M, Livermore DM, *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase detected in *E. coli* recovered from calves in Wales. *Vet Rec* 2005 Feb 5;156(6):186-187.

-
- (127) Hopkins KL, Liebana E, Villa L, Batchelor M, Threlfall EJ, Carattoli A. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among *Yersinia enterocolitica* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 Sep;50(9):3203-3206.
- (128) Kojima A, Ishii Y, Ishihara K, Esaki H, Asai T, Oda C, *et al.* Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Aug;49(8):3533-3537.
- (129) Shiraki Y, Shibata N, Doi Y, Arakawa Y. *Escherichia coli* producing CTX-M-2 beta-lactamase in cattle, Japan. *Emerg Infect Dis* 2004 Jan;10(1):69-75.
- (130) Duan RS, Sit TH, Wong SS, Wong RC, Chow KH, Mak GC, *et al.* *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases in food animals in Hong Kong. *Microb Drug Resist* 2006 Summer;12(2):145-148.
- (131) Liu JH, Wei SY, Ma JY, Zeng ZL, Lu DH, Yang GX, *et al.* Detection and characterisation of CTX-M and CMY-2 beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates from farm animals in Guangdong Province of China. *Int J Antimicrob Agents* 2007 May;29(5):576-581.
- (132) Carattoli A, Lovari S, Franco A, Cordaro G, Di Matteo P, Battisti A. Extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Feb;49(2):833-835.
- (133) Costa D, Poeta P, Brinas L, Saenz Y, Rodrigues J, Torres C. Detection of CTX-M-1 and TEM-52 beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. *J Antimicrob Chemother* 2004 Nov;54(5):960-961.
- (134) Costa D, Poeta P, Saenz Y, Vinue L, Rojo-Bezares B, Jouini A, *et al.* Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *J Antimicrob Chemother* 2006 Dec;58(6):1311-1312.
- (135) Blanc V, Mesa R, Saco M, Lavilla S, Prats G, Miro E, *et al.* ESBL- and plasmidic class C beta-lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Vet Microbiol* 2006 Dec 20;118(3-4):299-304.
- (136) Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR, Cortes P, Gonzalez JJ, Lavilla S, *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother* 2006 Jul;58(1):211-215.
-

- (137) Jouini A, Vinue L, Slama KB, Saenz Y, Klibi N, Hammami S, *et al.* Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *J Antimicrob Chemother* 2007 Nov;60(5):1137-1141.
- (138) Gillaspay AF, Worrell V, Orvis J, Roe BA, Dyer W, Iandolo JJ. The *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 genome, p. 381-412. *In* V. Fischetti, R. Novick, J. Ferretti, D. Portnoy, and J. Rood (ed.), Gram positive pathogens. ASM Press, Washington, DC. 2006.
- (139) Jacoby GA, Han P. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1996 Apr;34(4):908-911.
- (140) Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Jun;87(12):4645-4649.
- (141) Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966 Apr;45(4):493-496.
- (142) Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, Laurans G, Arlet G, Thien HV, *et al.* Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum beta-lactamase type. *Emerg Infect Dis* 2005 Jan;11(1):54-61.
- (143) Guinee PA, Agterberg CM, Jansen WH. *Escherichia coli* O antigen typing by means of a mechanized microtechnique. *Appl Microbiol* 1972 Jul;24(1):127-131.
- (144) Blanco J, Blanco M, Alonso MP, Blanco JE, Garabal JI, Gonzalez EA. Serogroups of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factors CNF1 and CNF2. *FEMS Microbiol Lett* 1992 Sep 15;75(2-3):155-159.
- (145) Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981 Mar;145(3):1365-1373.
- (146) Lavollay M, Mamlouk K, Frank T, Akpabie A, Burghoffer B, Ben Redjeb S, *et al.* Clonal dissemination of a CTX-M-15 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strain in the Paris area, Tunis, and Bangui. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 Jul;50(7):2433-2438.
- (147) 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 Nov;50(11):3953-3955.
- (148) Eckert C, Gautier V, Arlet G. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*_{CTX-M} genes. *J Antimicrob Chemother* 2006 Jan;57(1):14-23.

-
- (149) Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 1984 Jul;12(1):19-36.
- (150) Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005 Dec;63(3):219-228.
- (151) Doi Y, Paterson DL, Egea P, Pascual A, Lopez-Cerero L, Navarro MD, *et al.* Extended-spectrum and CMY-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. *Clin Microbiol Infect* 2010 Jan;16(1):33-38.
- (152) Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill* 2008 Nov 20;13(47):19044.
- (153) Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, *et al.* CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007 Feb;59(2):165-174.
- (154) Jakobsen L, Kurbasic A, Skjot-Rasmussen L, Ejrnaes K, Porsbo LJ, Pedersen K, *et al.* *Escherichia coli* Isolates from Broiler Chicken Meat, Broiler Chickens, Pork, and Pigs Share Phylogroups and Antimicrobial Resistance with Community-Dwelling Humans and Patients with Urinary Tract Infection. *Foodborne Pathog Dis* 2009 Dec 29.
- (155) Hernandez JR, Martinez-Martinez L, Canton R, Coque TM, Pascual A, Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 May;49(5):2122-2125.
- (156) Diaz MA, Hernandez-Bello JR, Rodriguez-Bano J, Martinez-Martinez L, Calvo J, Blanco J, *et al.* Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: second nationwide study. *J Clin Microbiol* 2010 Aug;48(8):2840-2845.
- (157) Rhomberg PR, Jones RN. Summary trends for the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program: a 10-year experience in the United States (1999-2008). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009 Dec;65(4):414-426.
- (158) Turner PJ. Meropenem activity against European isolates: report on the MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) 2006 results. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008 Feb;60(2):185-192.
- (159) Reinert RR, Low DE, Rossi F, Zhang X, Wattal C, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin
-

- and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. *J Antimicrob Chemother* 2007 Nov;60(5):1018-1029.
- (160) Bochicchio GV, Baquero F, Hsueh PR, Paterson DL, Rossi F, Snyder TA, *et al.* In vitro susceptibilities of *Escherichia coli* isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide in 2002-2004: results from SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends). *Surg Infect (Larchmt)* 2006 Dec;7(6):537-545.
- (161) Bush K. Extended-spectrum beta-lactamases in North America, 1987-2006. *Clin Microbiol Infect* 2008 Jan;14 Suppl 1:134-143.
- (162) Peirano G, Costello M, Pitout JD. Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from the Chicago area: high prevalence of ST131 producing CTX-M-15 in community hospitals. *Int J Antimicrob Agents* 2010 Jul;36(1):19-23.
- (163) Morosini MI, Garcia-Castillo M, Coque TM, Valverde A, Novais A, Loza E, *et al.* Antibiotic coresistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and in vitro activity of tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 Aug;50(8):2695-2699.
- (164) Novais A, Canton R, Valverde A, Machado E, Galan JC, Peixe L, *et al.* Dissemination and persistence of *bla*_{CTX-M-9} are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1-alpha, and IncFI groups. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 Aug;50(8):2741-2750.
- (165) Machado E, Ferreira J, Novais A, Peixe L, Canton R, Baquero F, *et al.* Preservation of integron types among *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases in a Spanish hospital over a 15-year period (1988 to 2003). *Antimicrob Agents Chemother* 2007 Jun;51(6):2201-2204.
- (166) Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P, Lambert T. Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Jul;49(7):2949-2953.
- (167) Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 Oct;52(10):3801-3804.
- (168) Rodriguez-Martinez JM, Cano ME, Velasco C, Martinez-Martinez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother* 2010 Oct 1.

-
- (169) Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 2005 Sep;56(3):463-469.
- (170) Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 2006 Oct;6(10):629-640.
- (171) Briales A, Rodriguez-Martinez JM, Velasco C, de Alba PD, Rodriguez-Bano J, Martinez-Martinez L, *et al.* 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 May;39(5):431-434.
- (172) Parks AR, Peters JE. Transposon Tn7 is widespread in diverse bacteria and forms genomic islands. *J Bacteriol* 2007 Mar;189(5):2170-2173.
- (173) Baquero F. From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2004 Jun;2(6):510-518.
- (174) Partridge SR. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2011 Sep;35(5):820-855.
- (175) Oteo J, Bautista V, Lara N, Cuevas O, Arroyo M, Fernandez S, *et al.* Parallel increase in community use of fosfomicin and resistance to fosfomicin in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2010 Nov;65(11):2459-2463.
- (176) Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 2009 Oct;22(4):664-689.
- (177) Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, *et al.* Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2006 Jan;12(1):83-88.
- (178) Blanco M, Alonso MP, Nicolas-Chanoine MH, Dahbi G, Mora A, Blanco JE, *et al.* Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum {beta}-lactamases in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 2009 Jun;63(6):1135-1141.
- (179) Radice M, Power P, Di Conza J, Gutkind G. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Feb;46(2):602-604.
- (180) Gazouli M, Sidorenko SV, Tzelepi E, Kozlova NS, Gladin DP, Tzouvelekis LS. A plasmid-mediated beta-lactamase conferring resistance to cefotaxime in a *Salmonella typhimurium* clone found in St Petersburg, Russia. *J Antimicrob Chemother* 1998 Jan;41(1):119-121.
-

- (181) Tzouvelekis LS, Gazouli M, Markogiannakis A, Paraskaki E, Legakis NJ, Tzelepi E. Emergence of resistance to third-generation cephalosporins amongst *Salmonella typhimurium* isolates in Greece: report of the first three cases. *J Antimicrob Chemother* 1998 Aug;42(2):273-275.
- (182) Bradford PA, Yang Y, Sahm D, Grope I, Gardovska D, Storch G. CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. *Antimicrob Agents Chemother* 1998 Aug;42(8):1980-1984.
- (183) Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, *et al.* Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2003 Nov;47(11):3554-3560.
- (184) Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2003 Dec;47(12):3724-3732.
- (185) Mushtaq S, Woodford N, Potz N, Livermore DM. Detection of CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 2003 Sep;52(3):528-529.
- (186) Bernard H, Tancrede C, Livrelli V, Morand A, Barthelemy M, Labia R. A novel plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase not derived from TEM- or SHV-type enzymes. *J Antimicrob Chemother* 1992 May;29(5):590-592.
- (187) Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 1990 Sep-Oct;18(5):294-298.
- (188) Power P, Radice M, Barberis C, de Mier C, Mollerach M, Maltagliatti M, *et al.* Cefotaxime-hydrolysing beta lactamases in *Morganella morganii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999 Oct;18(10):743-747.
- (189) Baraniak A, Fielt J, Sulikowska A, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase-producing microorganisms of the family *Enterobacteriaceae* in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Jan;46(1):151-159.
- (190) Baraniak A, Sadowy E, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Two different extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in one of the first ESBL-producing *Salmonella* isolates in Poland. *J Clin Microbiol* 2002 Mar;40(3):1095-1097.
- (191) Gniadkowski M, Schneider I, Palucha A, Jungwirth R, Mikiewicz B, Bauernfeind A. Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in

-
- Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 1998 Apr;42(4):827-832.
- (192) Palucha A, Mikiewicz B, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Concurrent outbreaks of extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms of the family *Enterobacteriaceae* in a Warsaw hospital. *J Antimicrob Chemother* 1999 Oct;44(4):489-499.
- (193) Doucet-Populaire F, Ghnassia JC, Bonnet R, Sirot J. First isolation of a CTX-M-3-producing *Enterobacter cloacae* in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 Nov;44(11):3239-3240.
- (194) Gazouli M, Tzelepi E, Sidorenko SV, Tzouvelekis LS. Sequence of the gene encoding a plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase (CTX-M-4): involvement of serine 237 in cephalosporin hydrolysis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998 May;42(5):1259-1262.
- (195) Tassios PT, Gazouli M, Tzelepi E, Milch H, Kozlova N, Sidorenko S, *et al.* Spread of a *Salmonella typhimurium* clone resistant to expanded-spectrum cephalosporins in three European countries. *J Clin Microbiol* 1999 Nov;37(11):3774-3777.
- (196) Gazouli M, Tzelepi E, Markogiannakis A, Legakis NJ, Tzouvelekis LS. Two novel plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamases (CTX-M-5 and CTX-M-6) from *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol Lett* 1998 Aug 15;165(2):289-293.
- (197) Bonnet R, Sampaio JL, Labia R, De Champs C, Sirot D, Chanal C, *et al.* A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 Jul;44(7):1936-1942.
- (198) Sabate M, Miro E, Navarro F, Verges C, Aliaga R, Mirelis B, *et al.* 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 Jun;49(6):989-997.
- (199) Kariuki S, Corkill JE, Revathi G, Musoke R, Hart CA. Molecular characterization of a novel plasmid-encoded cefotaximase (CTX-M-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kenya. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 Jul;45(7):2141-2143.
- (200) Ma L, Ishii Y, Chang FY, Yamaguchi K, Ho M, Siu LK. CTX-M-14, a plasmid-mediated CTX-M type extended-spectrum beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Jun;46(6):1985-1988.
-

- (201) Pai H, Choi EH, Lee HJ, Hong JY, Jacoby GA. Identification of CTX-M-14 extended-spectrum beta-lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *J Clin Microbiol* 2001 Oct;39(10):3747-3749.
- (202) Bou G, Cartelle M, Tomas M, Canle D, Molina F, Moure R, *et al.* Identification and broad dissemination of the CTX-M-14 beta-lactamase in different *Escherichia coli* strains in the northwest area of Spain. *J Clin Microbiol* 2002 Nov;40(11):4030-4036.
- (203) Baraniak A, Fielt J, Hryniewicz W, Nordmann P, Gniadkowski M. Ceftazidime-hydrolysing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in Poland. *J Antimicrob Chemother* 2002 Sep;50(3):393-396.
- (204) Cao V, Lambert T, Courvalin P. ColE1-like plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-17. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 May;46(5):1212-1217.
- (205) Poirel L, Naas T, Le Thomas I, Karim A, Bingen E, Nordmann P. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 Dec;45(12):3355-3361.
- (206) Brenwald NP, Jevons G, Andrews JM, Xiong JH, Hawkey PM, Wise R. An outbreak of a CTX-M-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: the importance of using cefpodoxime to detect extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2003 Jan;51(1):195-196.
- (207) Bonnet R, Recule C, Baraduc R, Chanal C, Sirot D, De Champs C, *et al.* Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. *J Antimicrob Chemother* 2003 Jul;52(1):29-35.
- (208) Ma L, Ishii Y, Ishiguro M, Matsuzawa H, Yamaguchi K. Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A beta-lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrob Agents Chemother* 1998 May;42(5):1181-1186.
- (209) Decousser JW, Poirel L, Nordmann P. Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 Dec;45(12):3595-3598.
- (210) Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Sep;46(9):3045-3049.
- (211) Poirel L, Kampfer 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 Dec;46(12):4038-4040.
- (212) Goldstein FW. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections in France. Multicentre Study Group. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000 Feb;19(2):112-117.
- (213) Arpin C, Dubois V, Maugein J, Jullin J, Dutilh B, Brochet JP, *et al.* Clinical and molecular analysis of extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteria in the community setting. *J Clin Microbiol* 2005 Oct;43(10):5048-5054.
- (214) Quentin C, Arpin C, Dubois V, Andre C, Lagrange I, Fischer I, *et al.* Antibiotic resistance rates and phenotypes among isolates of *Enterobacteriaceae* in French extra-hospital practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004 Mar;23(3):185-193.
- (215) Daza R, Gutierrez J, Piedrola G. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents* 2001 Sep;18(3):211-215.
- (216) Colodner R, Keness Y, Chazan B, Raz R. Antimicrobial susceptibility of community-acquired uropathogens in northern Israel. *Int J Antimicrob Agents* 2001 Aug;18(2):189-192.
- (217) Pitout JD, Hanson ND, Church DL, Laupland KB. Population-based laboratory surveillance for *Escherichia coli*-producing extended-spectrum beta-lactamases: importance of community isolates with *bla*_{CTX-M} genes. *Clin Infect Dis* 2004 Jun 15;38(12):1736-1741.
- (218) Brigante G, Luzzaro F, Perilli M, Lombardi G, Coli A, Rossolini GM, *et al.* Evolution of CTX-M-type beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *Int J Antimicrob Agents* 2005 Feb;25(2):157-162.
- (219) Munday CJ, Whitehead GM, Todd NJ, Campbell M, Hawkey PM. Predominance and genetic diversity of community- and hospital-acquired CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in York, UK. *J Antimicrob Chemother* 2004 Sep;54(3):628-633.
- (220) Luzzaro F, Mezzatesta M, Mugnaioli C, Perilli M, Stefani S, Amicosante G, *et al.* Trends in production of extended-spectrum beta-lactamases among enterobacteria of medical interest: report of the second Italian nationwide survey. *J Clin Microbiol* 2006 May;44(5):1659-1664.
-

- (221) Pournaras S, Ikonomidis A, Sofianou D, Tsakris A, Maniatis AN. CTX-M-type beta-lactamases affect community *Escherichia coli* treatment, Greece. *Emerg Infect Dis* 2004 Jun;10(6):1163-1164.
- (222) Boyd DA, Tyler S, Christianson S, McGeer A, Muller MP, Willey BM, *et al.* Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Oct;48(10):3758-3764.
- (223) Yumuk Z, Afacan G, Nicolas-Chanoine MH, Sotto A, Lavigne JP. Turkey: a further country concerned by community-acquired *Escherichia coli* clone O25-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 2008 Aug;62(2):284-288.
- (224) Woodford N, Carattoli A, Karisik E, Underwood A, Ellington MJ, Livermore DM. Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 Oct;53(10):4472-4482.
- (225) Velasco C, Romero L, Martinez JM, Rodriguez-Bano J, Pascual A. Analysis of plasmids encoding extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) from *Escherichia coli* isolated from non-hospitalised patients in Seville. *Int J Antimicrob Agents* 2007 Jan;29(1):89-92.
- (226) Morris D, Boyle F, Buckley V, Xu L, Hanahoe B, Hawkey P, *et al.* CTX-M enzymes are the predominant extended-spectrum beta-lactamases produced by *Enterobacteriaceae* in Ireland. *J Antimicrob Chemother* 2009 Oct;64(4):864-866.
- (227) Arpin C, Coulange L, Dubois V, Andre C, Fischer I, Fourmaux S, *et al.* Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* strains in various types of private health care centers. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 Sep;51(9):3440-3444.
- (228) Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 2000 Jan;181(1):261-272.
- (229) Rodriguez-Bano J, Mingorance J, Fernandez-Romero N, Serrano L, Lopez-Cerero L, Pascual A, *et al.* Virulence Profiles of Bacteremic Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli*: Association with Epidemiological and Clinical Features. *PLoS One* 2012;7(9):e44238.

-
- (230) Lavilla S, Gonzalez-Lopez JJ, Miro E, Dominguez A, Llagostera M, Bartolome RM, *et al.* Dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria: the food-borne outbreak lesson. *J Antimicrob Chemother* 2008 Jun;61(6):1244-1251.
- (231) Machado E, Coque TM, Canton R, Sousa JC, Peixe L. Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *J Antimicrob Chemother* 2008 August 1;62(2):296-302.
- (232) Cohen Stuart J, van den Munckhof T, Voets G, Scharringa J, Fluit A, Hall ML. Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. *Int J Food Microbiol* 2012 Mar 15;154(3):212-214.
- (233) Kola A, Kohler C, Pfeifer Y, Schwab F, Kuhn K, Schulz K, *et al.* High prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in organic and conventional retail chicken meat, Germany. *J Antimicrob Chemother* 2012 Nov;67(11):2631-2634.
- (234) Ben Slama K, Jouini A, Ben Sallem R, Somalo S, Saenz Y, Estepa V, *et al.* Prevalence of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolates in food samples in Tunisia, and characterization of integrons and antimicrobial resistance mechanisms implicated. *Int J Food Microbiol* 2010 Feb 28;137(2-3):281-286.
- (235) Corry JE, Allen VM, Hudson WR, Breslin MF, Davies RH. Sources of *Salmonella* on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and methods of control. *J Appl Microbiol* 2002;92(3):424-432.
- (236) Rasschaert G, Houf K, De Zutter L. Impact of the slaughter line contamination on the presence of *Salmonella* on broiler carcasses. *J Appl Microbiol* 2007 Aug;103(2):333-341.
- (237) Olsen JE, Brown DJ, Madsen M, Bisgaard M. Cross-contamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markers. *J Appl Microbiol* 2003;94(5):826-835.
- (238) Laube H, Friese A, von Salviati C, Guerra B, Kasbohrer A, Kreienbrock L, *et al.* Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* at German broiler chicken fattening farms. *Appl Environ Microbiol* 2013 Aug;79(16):4815-4820.
- (239) Hansen KH, Damborg P, Andreasen M, Nielsen SS, Guardabassi L. Carriage and fecal counts of cefotaxime M-producing *Escherichia coli* in pigs: a longitudinal study. *Appl Environ Microbiol* 2013 Feb;79(3):794-798.
-

- (240) Dierikx CM, van der Goot JA, Smith HE, Kant A, Mevius DJ. Presence of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production pyramid: a descriptive study. PLoS One 2013 Nov 7;8(11):e79005.
- (241) Viedma Gil de Vergara P, Colomer Revuelta C, Serra Majem L. Assessment of the effectiveness of health training courses offered for food handlers in a health care district of Gandia, Valencia. Rev Esp Salud Publica 2000 May-Jun;74(3):299-307.
- (242) Redmond EC, Griffith CJ. Consumer food handling in the home: a review of food safety studies. J Food Prot 2003 Jan;66(1):130-161.
- (243) Jensen DA, Friedrich LM, Harris LJ, Danyluk MD, Schaffner DW. Quantifying transfer rates of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 between fresh-cut produce and common kitchen surfaces. J Food Prot 2013 Sep;76(9):1530-1538.
- (244) Bortolaia V, Guardabassi L, Bisgaard M, Larsen J, Bojesen AM. *Escherichia coli* producing CTX-M-1, -2, and -9 group beta-lactamases in organic chicken egg production. Antimicrob Agents Chemother 2010 Aug;54(8):3527-3528.
- (245) Musgrove MT, Jones DR, Northcutt JK, Cox NA, Harrison MA, Fedorka-Cray PJ, et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolated from commercial shell eggs. Poult Sci 2006 Sep;85(9):1665-1669.
- (246) Machado E, Coque TM, Canton R, Novais A, Sousa JC, Baquero F, et al. High diversity of extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. J Antimicrob Chemother 2007 Dec;60(6):1370-1374.
- (247) Dhanji H, Murphy NM, Doumith M, Durmus S, Lee SS, Hope R, et al. Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw chicken imported into the UK. J Antimicrob Chemother 2010 Dec;65(12):2534-2537.
- (248) Warren RE, Ensor VM, O'Neill P, Butler V, Taylor J, Nye K, et al. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in the UK. J Antimicrob Chemother 2008 Mar;61(3):504-508.
- (249) Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Cohen Stuart J, Voets GM, van den Munckhof MP, van Essen-Zandbergen A, et al. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. Clin Microbiol Infect 2011 Jun;17(6):873-880.

-
- (250) Overdevest I, Willemsen I, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey P, *et al.* Extended-Spectrum B-Lactamase Genes of *Escherichia coli* in Chicken Meat and Humans, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2011 Jul;17(7):1216-1222.
- (251) Smet A, Rasschaert G, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Butaye P, *et al.* In situ ESBL conjugation from avian to human *Escherichia coli* during cefotaxime administration. *J Appl Microbiol* 2011 Feb;110(2):541-549.
- (252) Johnson JR, Nicolas-Chanoine MH, DebRoy C, Castanheira M, Robicsek A, Hansen G, *et al.* Comparison of *Escherichia coli* ST131 pulsotypes, by epidemiologic traits, 1967-2009. *Emerg Infect Dis* 2012 Apr;18(4):598-607.
- (253) Cortes P, Blanc V, Mora A, Dahbi G, Blanco JE, Blanco M, *et al.* Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Appl Environ Microbiol* 2010 May;76(9):2799-2805.
- (254) Graziani C, Luzzi I, Corro M, Tomei F, Parisi G, Giufre M, *et al.* Phylogenetic background and virulence genotype of ciprofloxacin-susceptible and ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strains of human and avian origin. *J Infect Dis* 2009 Apr 15;199(8):1209-1217.
- (255) Martinez-Martinez L, Fernandez F, Perea EJ. Relationship between haemolysis production and resistance to fluoroquinolones among clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 1999 Feb;43(2):277-279.
- (256) Vila J, Simon K, Ruiz J, Horcajada JP, Velasco M, Barranco M, *et al.* Are quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* less virulent? *J Infect Dis* 2002 Oct 1;186(7):1039-1042.
- (257) Velasco M, Horcajada JP, Mensa J, Moreno-Martinez A, Vila J, Martinez JA, *et al.* Decreased invasive capacity of quinolone-resistant *Escherichia coli* in patients with urinary tract infections. *Clin Infect Dis* 2001 Nov 15;33(10):1682-1686.
- (258) Johnson JR, Porter SB, Zhanel G, Kuskowski MA, Denamur E. Virulence of *Escherichia coli* clinical isolates in a murine sepsis model in relation to sequence type ST131 status, fluoroquinolone resistance, and virulence genotype. *Infect Immun* 2012 Apr;80(4):1554-1562.
- (259) Pitout JD, Laupland KB, Church DL, Menard ML, Johnson JR. Virulence factors of *Escherichia coli* isolates that produce CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Nov;49(11):4667-4670.
- (260) Karisik E, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Virulence factors in *Escherichia coli* with CTX-M-15 and other extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2008 Jan;61(1):54-58.
-

- (261) Rock W, Colodner R, Chazan B, Elias M, Raz R. Ten years surveillance of antimicrobial susceptibility of community-acquired *Escherichia coli* and other uropathogens in northern Israel (1995-2005). *Isr Med Assoc J* 2007 Nov;9(11):803-805.
- (262) Gobernado M, Valdes L, Alos JI, Garcia-Rey C, Dal-Re R, Garcia-de-Lomas J, *et al.* Quinolone resistance in female outpatient urinary tract isolates of *Escherichia coli*: age-related differences. *Rev Esp Quimioter* 2007 Jun;20(2):206-210.
- (263) Smith SP, Manges AR, Riley LW. Temporal changes in the prevalence of community-acquired antimicrobial-resistant urinary tract infection affected by *Escherichia coli* clonal group composition. *Clin Infect Dis* 2008 Mar 1;46(5):689-695.
- (264) Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother* 2011 Jan;66(1):1-14.
- (265) Blanco JE, Blanco M, Mora A, Jansen WH, Garcia V, Vazquez ML, *et al.* Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicaemic chickens in Galicia (northwest Spain). *Vet Microbiol* 1998 Mar 31;61(3):229-235.
- (266) Blanco JE, Blanco M, Mora A, Blanco J. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity. *J Clin Microbiol* 1997 Nov;35(11):2953-2957.
- (267) Bortolaia V, Guardabassi L, Trevisani M, Bisgaard M, Venturi L, Bojesen AM. High diversity of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from Italian broiler flocks. *Antimicrob Agents Chemother* 2010 Apr;54(4):1623-1626.
- (268) Giufre M, Graziani C, Accogli M, Luzzi I, Busani L, Cerquetti M, *et al.* *Escherichia coli* of human and avian origin: detection of clonal groups associated with fluoroquinolone and multidrug resistance in Italy. *J Antimicrob Chemother* 2012 Apr;67(4):860-867.
- (269) Oteo J, Diestra K, Juan C, Bautista V, Novais A, Perez-Vazquez M, *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. *Int J Antimicrob Agents* 2009 Aug;34(2):173-176.
- (270) Sun Y, Zeng Z, Chen S, Ma J, He L, Liu Y, *et al.* High prevalence of bla extended-spectrum beta(CTX-M)-lactamase genes in *Escherichia coli* isolates

- from pets and emergence of CTX-M-64 in China. *Clin Microbiol Infect* 2009 Nov 20.
- (271) Poeta P, Radhouani H, Pinto L, Martinho A, Rego V, Rodrigues R, *et al.* Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups. *J Basic Microbiol* 2009 Dec;49(6):584-588.
- (272) Poeta P, Radhouani H, Igrejas G, Goncalves A, Carvalho C, Rodrigues J, *et al.* Seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal *Escherichia coli* harboring CTX-M and TEM extended-spectrum beta-lactamases. *Appl Environ Microbiol* 2008 Dec;74(23):7439-7441.
- (273) Lu SY, Zhang YL, Geng SN, Li TY, Ye ZM, Zhang DS, *et al.* High diversity of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in an urban river sediment habitat. *Appl Environ Microbiol* 2010 Sep;76(17):5972-5976.
- (274) Reinthaler FF, Feierl G, Galler H, Haas D, Leitner E, Mascher F, *et al.* ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water Res* 2010 Mar;44(6):1981-1985.
- (275) Galvin S, Boyle F, Hickey P, Vellinga A, Morris D, Cormican M. Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources. *Appl Environ Microbiol* 2010 Jul;76(14):4772-4779.
- (276) Dalmau D, Navarro F, Mirelis B, Blanco J, Garau J, Prats G. *Escherichia coli* bacteraemia. Serotype O15:K52:H1 as a urinary pathogen. *J Hosp Infect* 1996 Nov;34(3):233-234.
- (277) Prats G, Navarro F, Mirelis B, Dalmau D, Margall N, Coll P, *et al.* *Escherichia coli* serotype O15:K52:H1 as a uropathogenic clone. *J Clin Microbiol* 2000 Jan;38(1):201-209.
- (278) Johnson JR, Stell AL, O'Bryan TT, Kuskowski M, Nowicki B, Johnson C, *et al.* Global molecular epidemiology of the O15:K52:H1 extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* clonal group: evidence of distribution beyond Europe. *J Clin Microbiol* 2002 Jun;40(6):1913-1923.
- (279) Cagnacci S, Gualco L, Debbia E, Schito GC, Marchese A. European emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25:H4-ST 131 and O15:K52:H1 causing community-acquired uncomplicated cystitis. *J Clin Microbiol* 2008 Aug;46(8):2605-2612.
- (280) Manges AR, Johnson JR, Foxman B, O'Bryan TT, Fullerton KE, Riley LW. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-

- resistant *Escherichia coli* clonal group. N Engl J Med 2001 Oct 4;345(14):1007-1013.
- (281) Johnson JR, Menard M, Johnston B, Kuskowski MA, Nichol K, Zhanel GG. Epidemic clonal groups of *Escherichia coli* as a cause of antimicrobial-resistant urinary tract infections in Canada, 2002 to 2004. Antimicrob Agents Chemother 2009 Jul;53(7):2733-2739.
- (282) Pitout JD, Campbell L, Church DL, Gregson DB, Laupland KB. Molecular characteristics of travel-related extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from the Calgary Health Region. Antimicrob Agents Chemother 2009 Jun;53(6):2539-2543.
- (283) Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Claeys G, et al. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by *Escherichia coli* isolated from hospitalized and nonhospitalized patients: emergence of CTX-M-15-producing strains causing urinary tract infections. Microb Drug Resist 2010 Jun;16(2):129-134.
- (284) Literacka E, Bedenic B, Baraniak A, Fiett J, Tonkic M, Jajic-Bencic I, et al. *bla*_{CTX-M} genes in *Escherichia coli* strains from Croatian Hospitals are located in new (*bla*_{CTX-M-3a}) and widely spread (*bla*_{CTX-M-3a} and *bla*_{CTX-M-15}) genetic structures. Antimicrob Agents Chemother 2009 Apr;53(4):1630-1635.
- (285) Clermont O, Dhanji H, Upton M, Gibreel T, Fox A, Boyd D, et al. Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. J Antimicrob Chemother 2009 Aug;64(2):274-277.
- (286) Courpon-Claudinon A, Lefort A, Panhard X, Clermont O, Dornic Q, Fantin B, et al. Bacteraemia caused by third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in France: prevalence, molecular epidemiology and clinical features. Clin Microbiol Infect 2011 Apr;17(4):557-565.
- (287) Arpin C, Quentin C, Grobost F, Cambau E, Robert J, Dubois V, et al. Nationwide survey of extended-spectrum {beta}-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the French community setting. J Antimicrob Chemother 2009 Jun;63(6):1205-1214.
- (288) Leflon-Guibout V, Blanco J, Amaqdouf K, Mora A, Guize L, Nicolas-Chanoine MH. Absence of CTX-M enzymes but high prevalence of clones, including clone ST131, among fecal *Escherichia coli* isolates from healthy subjects living in the area of Paris, France. J Clin Microbiol 2008 Dec;46(12):3900-3905.
- (289) Cerquetti M, Giufre M, Garcia-Fernandez A, Accogli M, Fortini D, Luzzi I, et al. Ciprofloxacin-resistant, CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131 clone in

- extraintestinal infections in Italy. *Clin Microbiol Infect* 2010 Oct;16(10):1555-1558.
- (290) Naseer U, Haldorsen B, Tofteland S, Hegstad K, Scheutz F, Simonsen GS, *et al.* Molecular characterization of CTX-M-15-producing clinical isolates of *Escherichia coli* reveals the spread of multidrug-resistant ST131 (O25:H4) and ST964 (O102:H6) strains in Norway. *APMIS* 2009 Jul;117(7):526-536.
- (291) Oteo J, Cercenado E, Cuevas O, Bautista V, Delgado-Iribarren A, Orden B, *et al.* 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 Jul;67(3):270-276.
- (292) Lau SH, Kaufmann ME, Livermore DM, Woodford N, Willshaw GA, Cheasty T, *et al.* UK epidemic *Escherichia coli* strains A-E, with CTX-M-15 beta-lactamase, all belong to the international O25:H4-ST131 clone. *J Antimicrob Chemother* 2008 Dec;62(6):1241-1244.
- (293) Lau SH, Reddy S, Cheesbrough J, Bolton FJ, Willshaw G, Cheasty T, *et al.* Major uropathogenic *Escherichia coli* strain isolated in the northwest of England identified by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2008 Mar;46(3):1076-1080.
- (294) Pitout JD, Gregson DB, Campbell L, Laupland KB. Molecular characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates causing bacteremia in the Calgary Health Region from 2000 to 2007: emergence of clone ST131 as a cause of community-acquired infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 Jul;53(7):2846-2851.
- (295) Suzuki S, Shibata N, Yamane K, Wachino J, Ito K, Arakawa Y. Change in the prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. *J Antimicrob Chemother* 2009 Jan;63(1):72-79.
- (296) Uchida Y, Mochimaru T, Morokuma Y, Kiyosuke M, Fujise M, Eto F, *et al.* Clonal spread in Eastern Asia of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* serogroup O25 strains, and associated virulence factors. *Int J Antimicrob Agents* 2010 May;35(5):444-450.
- (297) Lee MY, Choi HJ, Choi JY, Song M, Song Y, Kim SW, *et al.* Dissemination of ST131 and ST393 community-onset, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clones causing urinary tract infections in Korea. *J Infect* 2010 Feb;60(2):146-153.
- (298) Coelho A, Mora A, Mamani R, Lopez C, Gonzalez-Lopez JJ, Larrosa MN, *et al.* Spread of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131 producing CTX-M-15 and SHV-

- 12 with high virulence gene content in Barcelona (Spain). *J Antimicrob Chemother* 2011 Mar;66(3):517-526.
- (299) Cortes P, Blanc V, Mora A, Dahbi G, Blanco JE, Blanco M, *et al.* ESBL- and CMY-2-producing *Escherichia coli* potentially pathogenic for humans isolated from animal farms. First time detection of clonal groups O25b:H4-ST131-B2 CTX-M-9 and O25a-ST648-D CTX-M-32 in poultry farms. *Appl Environ Microbiol* 2010 Mar 12.
- (300) Ewers C, Grobbel M, Stamm I, Kopp PA, Diehl I, Semmler T, *et al.* Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *J Antimicrob Chemother* 2010 Apr;65(4):651-660.
- (301) Mora A, Herrera A, Mamani R, Lopez C, Alonso MP, Blanco JE, *et al.* Recent emergence of clonal group O25b:K1:H4-B2-ST131 *ibeA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates. *Appl Environ Microbiol* 2010 Nov;76(21):6991-6997.
- (302) Dhanji H, Patel R, Wall R, Doumith M, Patel B, Hope R, *et al.* Variation in the genetic environments of *bla*_{CTX-M-15} in *Escherichia coli* from the faeces of travellers returning to the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 2011 Feb 24.
- (303) Manges AR, Tabor H, Tellis P, Vincent C, Tellier PP. Endemic and epidemic lineages of *Escherichia coli* that cause urinary tract infections. *Emerg Infect Dis* 2008 Oct;14(10):1575-1583.
- (304) Forssten SD, Kolho E, Lauhio A, Lehtola L, Mero S, Oksaharju A, *et al.* Emergence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during the years 2000 and 2004 in Helsinki, Finland. *Clin Microbiol Infect* 2010 Aug;16(8):1158-1161.
- (305) EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA Journal* 2011;9(8):2322 .
- (306) Dolejska M, Matulova M, Kohoutova L, Literak I, Bardon J, Cizek A. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in turkey meat production farms in the Czech Republic: National survey reveals widespread isolates with *bla*_{SHV-12} genes on IncFII plasmids. *Lett Appl Microbiol* 2011 Sep;53(3):271-277.

-
- (307) O'Keefe A, Hutton TA, Schifferli DM, Rankin SC. First detection of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* urinary tract isolates from dogs and cats in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2010 Aug;54(8):3489-3492.
- (308) Silva N, Igrejas G, Rodrigues P, Rodrigues T, Goncalves A, Felgar AC, *et al.* Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci and extended-spectrum beta-lactamase-containing *Escherichia coli* isolates in wild birds from the Azores Archipelago. *Avian Pathol* 2011 Jul 5.
- (309) Carattoli A. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *Int J Med Microbiol* 2011 Dec;301(8):654-658.
- (310) Girlich D, Poirel L, Carattoli A, Kempf I, Lartigue MF, Bertini A, *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. *Appl Environ Microbiol* 2007 Jul;73(14):4681-4685.
- (311) Cloeckert A, Praud K, Lefevre M, Doublet B, Pardos M, Granier SA, *et al.* IncI1 plasmid carrying extended-spectrum-beta-lactamase gene *bla*_{CTX-M-1} in *Salmonella enterica* isolates from poultry and humans in France, 2003 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother* 2010 Oct;54(10):4484-4486.
- (312) Bortolaia V, Larsen J, Damborg P, Guardabassi L. Potential Pathogenicity and Host Range of Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates from Healthy Poultry. *Appl Environ Microbiol* 2011 Aug;77(16):5830-5833.
- (313) Moodley A, Guardabassi L. Transmission of IncN plasmids carrying *bla*_{CTX-M-1} between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 Apr;53(4):1709-1711.
- (314) Adler A, Gniadkowski M, Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, Hryniewicz W, *et al.* Transmission dynamics of ESBL-producing *Escherichia coli* clones in rehabilitation wards at a tertiary care centre. *Clin Microbiol Infect* 2012 Dec;18(12):E497-505.
- (315) Jorgensen CJ, Cavaco LM, Hasman H, Emborg HD, Guardabassi L. Occurrence of CTX-M-1-producing *Escherichia coli* in pigs treated with ceftiofur. *J Antimicrob Chemother* 2007 May;59(5):1040-1042.
- (316) Agerso Y, Aarestrup FM. Voluntary ban on cephalosporin use in Danish pig production has effectively reduced extended-spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* in slaughter pigs. *J Antimicrob Chemother* 2012 Nov 5.
- (317) Hornish RE, Kotarski SF. Cephalosporins in veterinary medicine - ceftiofur use in food animals. *Curr Top Med Chem* 2002 Jul;2(7):717-731.
-

- (318) Dutil L, Irwin R, Finley R, Ng LK, Avery B, Boerlin P, *et al.* Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerg Infect Dis* 2010 Jan;16(1):48-54.
- (319) Grave K, Torren-Edo J, Mackay D. Comparison of the sales of veterinary antibacterial agents between 10 European countries. *J Antimicrob Chemother* 2010 Sep;65(9):2037-2040.
- (320) Bednorz C, Oelgeschlager K, Kinnemann B, Hartmann S, Neumann K, Pieper R, *et al.* The broader context of antibiotic resistance: zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. *Int J Med Microbiol* 2013 Aug;303(6-7):396-403.

Anexos

ANEXOS**Anexo 1. Hoja de recogida de datos para alimentos cocinados**

Nº de muestra:

Fecha:

Nombre:

--

Tipo de muestra: (Marcar con una x)

ENSALADA

COCINADO

Fecha de elaboración:

--Ingredientes (Rellenar sólo si la muestra es ensalada)

--Observaciones:

--**MANTENER LA MUESTRA EN LA NEVERA HASTA LA ENTREGA**

Anexo 2. Hoja de recogida de datos epidemiológicos

Infección/colonización por microorganismos productores de β -lactamasas de espectro extendido. Formulario de datos de los casos

Nombre de la persona que rellena el formulario _____

Hospital _____

Fecha de cierre _____

Identificación del paciente (nombre/nº de historia):

Para pacientes ingresados: Fecha de ingreso (MM/DD/YY): ___/___/___

Procede de otro hospital: Sí No

En caso afirmativo, fecha de ingreso en dicho centro (MM/DD/YY):
___/___/___

Principal motivo de ingreso/consulta: _____

Fecha del primer cultivo BLEE (MM/DD/YY): ___/___/___

DATOS DEMOGRAPHICOS:

Edad: _____ Sexo: Hombre Mujer

Raza: † Blanca (no latinoamericano) † Latinoamericana † Negra † Asiática † Otra
(especificar): _____

CONTACTO PREVIO CON EL SISTEMA SANITARIO:

Localización del paciente en los 30 días previos al cultivo (puede señalarse más de uno):

Su casa Residencia Hospital de crónicos Centro de rehabilitación
Otros _____

Localización del paciente cuando se tomó el cultivo:

Urgencias Observación Consultas externas Servicio médico

UCI Servicio quirúrgico

Hospitalización de Pediatría Atención Primaria Residencia Otros (especificar):

Hospitalizaciones durante el año previo: Sí No; en caso afirmativo, especificar (fechas, motivo principal):

¿Ha recibido atención domiciliaria en los 30 días previos? Sí No. Si sí, especificar tipo (cura heridas, medicación IV, revisión médica, etc): _____

¿Ha sido atendido en consultas externas en los 30 días previos? Sí No

Catéter intravascular en las 48 h previas al cultivo: Sí No

Catéter urinario en las 48 h previas al cultivo: Sí No

Ventilación mecánica en las 48 h previas al cultivo: Sí No

Cirugía en los 30 días previos; Si afirmativo, especificar tipo y fecha:

¿Es un trabajador sanitario? Sí No. En caso afirmativo, especificar profesión y lugar de trabajo: _____

TRATAMIENTOS EN LOS ÚLTIMOS 30 DÍAS:

Quimioterapia Corticoides sistémicos Otra terapia inmunosupresora; especificar: _____

Radioterapia Omeprazol u otros inhibidores de bomba de protones

ENFERMEDADES DE BASE:

Diabetes mellitus: Tipo I Tipo II. EPOC

Enf. vascular: Coronaria Cerebrovascular Periférica Aneurisma aórtico

Enfermedad hepática: VHB VHC Cirrosis Otras (especificar):

Enfermedad renal crónica: Hemodiálisis Diálisis peritoneal ambulatoria

Infección VIH: CD4: _____, carga viral: _____

Neoplasia: Hematológica Linfoma Leucemia Otra (especificar):

Sólida (especificar): _____, metástasis: Sí No

Neutropenia (<500) en los 7 días previos al cultivo. Si afirmativo, leucocitos _____, neutrófilos: _____

Transplante; Si afirmativo, especificar:

Otras enfermedades de base:

Índice de Charlson: _____, ajustada por la edad: _____

ANTIBIÓTICOS RECIBIDOS: (al menos 2 días durante los 30 días previos al cultivo)

ANTIBIÓTICO	Fecha de inicio	Fecha de fin
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

DATOS DE LABORATORIO: (indicar los más alterados en los 2 días previos al cultivo)

Leucocitos	_____	Albúmina	_____
Neutrófilos %	_____	Proteínas totales	_____
Plaquetas	_____	Bilirrubina	_____
Creatinina	_____	SGOT (AST)	_____
	_____	SGPT (ALT)	_____
	_____		_____

DATOS MICROBIOLÓGICOS: (grapar los informes de Microbiología)

Microorganismo: _____ Muestra: _____ Si origen urinario:
leucocituria _____

Infection colonization indeterminado

Tipo de infección:

ITU: Cistitis Pielonefritis Otra _____

Infección respiratoria: Neumonía Otra _____

Piel y partes blandas: Úlcera crónica Pié diabético Celulitis
Otra _____

Infección intraabdominal: absceso hepático colangitis colecistitis
Otra _____

Peritonitis: primaria secundaria terciaria Otra _____

Bacteriemia primaria Otra infección

(especificar) _____

Para cualquier tipo de infección: Bacteriemia Infección quirúrgica

Aislamiento previo de microorganismo productor de BLEE:

Fecha Muestra Especie

Aislamiento posterior de microorganismo productor de BLEE:

Fecha Muestra Especie

TRATAMIENTO: Alergia a antimicrobianos: _____, _____,

Antibióticos para esta infección; día 1 es el día de la toma de la muestra

Antibiótico	Fecha inicio	Fecha fin	Dosis, intervalo, vía
1			
2			
3			
4			

EVOLUCIÓN:

Curación microbiológica: Confirmada; fecha del cultivo negativo (MM/DD/YY):

___/___/___

Presunta

Recidiva. Fecha (MM/DD/YY): ___/___/___, muestra: _____ (rellenar otro protocolo)

Si ingresado: fecha de alta (MM/DD/YY): ___/___/___

Destino: Domicilio Residencia Centro de rehabilitación Otro centro

Exitus. En caso de exitus:

Relacionado: Seguro Posible No Desconocido

Producción Científica

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

1. Doi Y, Paterson DL, **Egea P**, Pascual A, López-Cerero L, Navarro MD, Adams-Haduch JM, Qureshi ZA, Sidjabat HE, Rodríguez-Baño J. Extended-spectrum and CMY-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. Clin Microbiol Infect. 2010Jan;16(1):33-8.
2. López-Cerero L, **Egea P**, Serrano L, Navarro D, Mora A, Blanco J, Doi Y, Paterson DL, Rodríguez-Baño J, Pascual A. Characterisation of clinical and food animal *Escherichia coli* isolates producing CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase belonging to ST410 phylogroup A. Int J Antimicrob Agents. 2011 Apr;37(4):365-7.
3. López-Cerero L, **Egea P**, Rodríguez-Baño J, Pascual A. Similarities between the genetic environments of *bla*_{CTX-M-15} in *Escherichia coli* from clinical and food samples from Spain and overseas travellers. J Antimicrob Chemother. 2011 Sep;66(9):2177.
4. **Egea P**, López-Cerero L, Navarro MD, Rodríguez-Baño J, Pascual A. Assessment of the presence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in eggshells and ready-to-eat products. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011 Sep;30(9):1045-7.
5. **Egea P**, López-Cerero L, Torres E, Gómez-Sánchez Mdel C, Serrano L, NavarroSánchez-Ortiz MD, Rodriguez-Baño J, Pascual A. Increased raw poultry meat colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the south of Spain. Int J Food Microbiol. 2012 Oct 1;159(2):69-73.

