



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**  
**Facultad de Medicina**  
**Departamento de Microbiología**

**TESIS DOCTORAL**

**Prevalencia de *Escherichia coli* O25b:H4-ST131 productor o no de Betalactamasa de Espectro Extendido (BLEE) en el área de Sevilla.**

Trabajo realizado para alcanzar el grado de Doctor por, la Licenciada en Farmacia, Dña. María del Mar Bellido Barquero.

Sevilla, mayo de 2017





**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**  
**Facultad de Medicina**  
**Departamento de Microbiología**

Dr. D. Álvaro Pascual Hernández, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Sevilla y Dra. Dña. Lorena López Cerero, Profesora Asociada Clínica del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla,

**CERTIFICAN:**

Que la tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla que lleva por título "Prevalencia de *Escherichia coli* O25b:H4-ST131 productor o no de Betalactamasa de Espectro Extendido (BLEE) en el área de Sevilla" ha sido realizada por Dña. María del Mar Bellido Barquero 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 19 de mayo de 2017.

  
Fdo. Dr. D. Álvaro Pascual Hernández Fdo. Dra. Dña. Lorena López Cerero







## Agradecimientos

Me gustaría darle las gracias a todos y cada uno de los que han estado a mi lado durante este tiempo. Quizás no pueda escribir el nombre de todos los “contribuyentes”, pero ellos saben quiénes son.

En primer lugar darle las gracias a mis dos directores. Al Dr. Álvaro Pascual por permitirme realizar este trabajo bajo su tutela, por sus sabios consejos y haberme permitido compaginar el desarrollo de este proyecto con mi formación como Especialista en Microbiología. A la Dra. Lorena López Cerero por haberme ayudado y por haber confiado en mí en esta última etapa del proyecto.

Al Dr. Javier Aznar agradecerle haber sido mi tutor del Trabajo Fin de Máster y del Proyecto de Tesis Doctoral.

También mostrar mi agradecimiento a todos los Facultativos del Servicio de Microbiología del H. U. V. Macarena: Anabel, Nínive, Encarna, Marina, Inma y Felipe. Gracias por haber dejado que invirtiera tiempo de la especialidad en idas y venidas a” la cátedra”. Gracias por vuestras palabras de aliento, en especial al Dr. Muñoz. Gracias, Enrique. Gracias por todos tus consejos y gracias por escucharme, aún a día de hoy.

Gracias a los técnicos, en especial a Inma y Lola.

Gracias a Candela y Pilar por las risas que nos hemos echado y nos seguimos echando.

Agradecer a todos mis compañeros de “la cátedra” por compartir tantos buenos momentos y otros menos buenos; en definitiva, gracias por compartir. Gracias a Sofía, José Manuel, Isabel, Cármenes, Fernando, Rafa y, en especial, a “los niños”. Gracias, Alejandra, Eva, Fany, Paulita, Fran y sobre todo, a Lara. Gracias por todo lo que has hecho y por lo que eres, gracias por las risas que nos hemos echado y por todo lo que me has aguantado. Deciros que sois grandes trabajadores, pero mejores personas.

Gracias a mis compañeros de residencia, en especial a mi “R2”, Meme, y a mi “R chico”, Jesús. Con la especialidad se ganan muchas cosas y, una de los mejores, los amigos.

Gracias a mis padres, soy quien soy gracias a vosotros. Gracias por vuestro apoyo incondicional.

Gracias a mi marido. Sin ti, no lo hubiera conseguido. Gracias por animarme a continuar y por hacerme el camino más fácil.

Gracias a mi hija. Ella no lo sabe aún, pero me ha dado mucha fuerza para seguir adelante.

Gracias a mis amigas de toda la vida y a las más recientes, pero no menos importantes. Gracias, Paula, María Rosa, Emma, María, Belén, Lucía y María.







---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1. Generalidades de <i>E. coli</i></b> .....	<b>9</b>
<b>1.2. Patogenia</b> .....	<b>9</b>
1.2.1. <i>E. coli</i> comensal.....	9
1.2.2. <i>E. coli</i> patógeno intestinal.....	10
1.2.3. <i>E. coli</i> Extraintestinal (ExPEC) .....	10
1.2.3.1. Factores de virulencia .....	10
<b>1.3. Diversidad genética</b> .....	<b>13</b>
1.3.1. Serotipado .....	14
1.3.2. MLEE ( <i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i> ) .....	14
1.3.3. PFGE ( <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> ) .....	14
1.3.4. MLST ( <i>MultiLocus Sequence Typing</i> ).....	15
<b>1.4. Filogenia</b> .....	<b>16</b>
<b>1.5. Tratamiento de las infecciones por <i>E. coli</i></b> .....	<b>19</b>
1.5.1. Clasificación de los antimicrobianos .....	20
1.5.1.1. Betalactámicos.....	20
1.5.1.2. Quinolonas.....	23
1.5.1.3. Aminoglicósidos .....	23
1.5.1.4. Cotrimoxazol .....	23
1.5.1.5. Fosfomicina .....	23
<b>1.6. Resistencia a antimicrobianos en <i>E. coli</i></b> .....	<b>24</b>
1.6.1. Betalactámicos .....	24
1.6.1.1. $\beta$ -lactamasas.....	25
<b>1.7. Evolución reciente de la epidemiología de las BLEE</b> .....	<b>37</b>
1.7.1. Situación hasta el año 2000 .....	38
1.7.2. Situación a partir del año 2000 .....	39
<b>1.8. Dispersión de los genes <i>bla</i>. Elementos móviles</b> .....	<b>40</b>
1.8.1. Plásmidos .....	40
1.8.1.1. Clasificación de los plásmidos.....	41

---

---

<b>1.9. Clon ST131. Descubrimiento y características generales.....</b>	<b>43</b>
1.9.1. Características del clon ST131.....	43
1.9.2. Tipado de ST131 .....	44
1.9.3. Método de subtipado. Secuenciación de <i>fimH</i> .....	45
1.9.4. Aislados de <i>E. coli</i> ST131 productores de CTX-M-15 .....	45
1.9.5. Aislados de <i>E. coli</i> ST131 resistentes a fluorquinolonas .....	48
1.9.6. Plásmidos detectados en aislados de <i>E. coli</i> ST131 .....	49
1.9.7. Epidemiología de ST131 .....	49
1.9.7.1. Portadores sanos.....	49
1.9.7.2. Comida.....	¡Error! Marcador no definido.
1.9.7.3. Detección en animales de compañía .....	51
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>53</b>
<b>2.1. Justificación del estudio e hipótesis de trabajo.....</b>	<b>55</b>
<b>2.2. Objetivos de este estudio.....</b>	<b>56</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>57</b>
<b>3.1. Material.....</b>	<b>59</b>
3.1.1. Aislados clínicos y cepas bacterianas .....	59
3.1.1.1. Aislados clínicos .....	59
3.1.1.2. Colección de referencia de Johnson.....	60
3.1.1.3. Cepas control .....	61
3.1.1.4. Cepa receptora en experimentos de transformación .....	62
3.1.2. Medios de cultivo.....	62
3.1.3. Antibióticos .....	62
3.1.3.1. Suplementos de medios de cultivo.....	62
3.1.3.2. Discos para estudios de sensibilidad.....	63
3.1.4. Soluciones y reactivos.....	64
3.1.4.1. Soluciones y tampones de uso general.....	64
3.1.4.2. Soluciones y tampones utilizados en extracción de plásmidos. Método de Takahashi 66	

---

---

3.1.4.3.	Soluciones y tampones utilizados en la electroforesis de campo pulsante (PFGE).	66
3.1.5.	Productos químicos.....	68
3.1.6.	Cebadores.....	69
3.1.7.	Equipos .....	75
3.1.8.	Software .....	76
<b>3.2.</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>76</b>
3.2.1.	Aislamiento e identificación de aislados .....	76
3.2.1.1.	Colección prevalencia.....	76
3.2.1.2.	Colección histórica .....	77
3.2.2.	Detección de marcadores moleculares mediante PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) .....	77
3.2.3.	Detección de ST131. Colección de prevalencia e histórica.....	78
3.2.3.1.	Detección del serogrupo O25b .....	78
3.2.3.2.	Detección del alelo 3 del gen <i>pabB</i> .....	79
3.2.3.3.	Análisis de filogrupo .....	79
3.2.4.	Estudio de sensibilidad a antimicrobianos.....	80
3.2.4.1.	Colección de prevalencia.....	80
3.2.4.2.	Colecciones histórica y Lisboa .....	80
3.2.5.	Métodos fenotípicos para la detección de enzimas BLEE.....	80
3.2.6.	Caracterización de enzimas BLEE .....	81
3.2.6.1.	PCR de genes <i>bla</i> .....	81
3.2.6.2.	Secuenciación de genes <i>bla</i> .....	81
3.2.7.	Estudio de la relación clonal mediante <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE) .....	82
3.2.7.1.	Colección prevalencia.....	83
3.2.7.2.	Colección histórica .....	83
3.2.7.3.	Colección de Lisboa .....	83
3.2.7.4.	Colección de Johnson .....	83
3.2.7.5.	Interpretación de los resultados .....	83
3.2.8.	Subtipado de aislados ST131. <i>FimH</i> .....	84

---

---

3.2.9.	Análisis de plásmidos.....	84
3.2.9.1.	Transformación .....	84
3.2.9.2.	Caracterización de los grupos de incompatibilidad plasmídica. Tipado y subtipado.	85
3.2.9.3.	Co-determinantes de resistencia.....	86
3.2.9.4.	Factores de virulencia .....	86
3.2.9.5.	Sistemas de adicción.....	86
3.2.9.6.	Restricción de ADN plasmídico .....	86
3.2.10.	Métodos informáticos.....	87
3.2.11.	Métodos estadísticos .....	87
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>89</b>
<b>4.1.</b>	<b>Análisis de la prevalencia del clon ST131 en el área de Sevilla .....</b>	<b>91</b>
4.1.1.	Sensibilidad a antimicrobianos .....	96
4.1.2.	Estudio de la relación clonal .....	98
4.1.3.	Subtipado ( <i>fimH</i> ).....	102
<b>4.2.</b>	<b>Animales de compañía .....</b>	<b>105</b>
4.2.1.	Estudio de la relación clonal de aislados portugueses y españoles .....	105
4.2.2.	Sensibilidad a antimicrobianos .....	107
4.2.2.1.	Comparación de aislados de individuos portugueses y españoles con los aislados de animales de compañía.....	107
4.2.2.2.	Comparación de aislados de individuos con los aislados de animales de compañía, ambos portugueses. ....	108
4.2.2.3.	Comparación de aislados de individuos españoles y portugueses .....	109
4.2.3.	Caracterización de plásmidos.....	109
4.2.3.1.	Tipado de plásmidos. Grupos de incompatibilidad y replicones .....	110
4.2.3.2.	Determinantes de resistencia.....	114
4.2.3.3.	Factores de virulencia .....	115
4.2.3.4.	Sistemas de adicción.....	115
4.2.3.5.	Relación genética.....	118
4.2.4.	Colección histórica.....	119
4.2.4.1.	Prevalencia de ST131.....	119

---

---

4.2.4.2.	Filogrupos.....	121
4.2.4.3.	Sensibilidad a antimicrobianos .....	124
4.2.4.4.	Estudio de clonalidad.....	129
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>133</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>157</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>161</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>203</b>





# 1. Introducción



## 1.1. Generalidades de *E. coli*

En 1885, Theodore von Escherich aisló *Bacterium coli commune* a partir de heces de neonatos y niños sanos (1). Pero hasta el año 1954 no es denominada *Escherichia coli*, en honor a su descubridor (2).

Esta especie junto con otras cinco pertenecen al género *Escherichia*, el cual se engloba dentro de la familia *Enterobacteriaceae*. De todas las especies del género, *E. coli* es la más importante para el ser humano por formar parte de la microbiota intestinal de individuos sanos y otros mamíferos de sangre caliente, llegando a ser la bacteria anaerobia facultativa más abundante en el intestino grueso del ser humano. Y por otro lado, por agrupar cepas que pueden causar infecciones intestinales y extraintestinales, tanto en individuos sanos como inmunodeprimidos (3). Entre las infecciones más comunes producidas por *E. coli* se encuentran las infecciones del tracto urinario (80-90%), seguidas de bacteriemias, meningitis y diarreas (4).

## 1.2. Patogenia

La patogenia de *E. coli* es variable y, en función de ella, se pueden distinguir tres grupos principales: *E. coli* comensal, *E. coli* patógeno intestinal y *E. coli* patógeno extraintestinal.

### 1.2.1. *E. coli* comensal

Las cepas comensales de *E. coli* constituyen gran parte de la microbiota del intestino del ser humano, mamíferos y aves. Son cepas perfectamente adaptadas a la coexistencia con su hospedador, el cual no desarrolla sintomatología, salvo en casos de inmunodepresión.

---

## 1.2.2. *E. coli* patógeno intestinal

Las cepas patógenas intestinales de *E. coli* rara vez se encuentran formando parte de la flora fecal de individuos sanos, sino que son patógenos obligados. En la actualidad según la patogénesis y características epidemiológicas, se han definido 6 patotipos de *E. coli*: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC). Los tres primeros son causantes de diarreas acuosas, mientras que los tres últimos producen diarreas sanguinolentas y/o invasivas. Los mecanismos de acción son diferentes según el patotipo: producción de toxinas (ETEC, EHEC, EAEC), factores de adherencia (EHEC, EPEC, EAEC, DAEC) e invasión del epitelio (EIEC).

## 1.2.3. *E. coli* Extraintestinal (ExPEC)

Estas cepas son epidemiológica y filogenéticamente distintas de las comensales e intestinales. Son capaces de causar infecciones en los seres humanos y animales de sangre caliente, no son capaces de causar una infección entérica, pero sí de instaurarse de forma estable en el intestino del hospedador y llegar a colonizar el 20% de humanos sanos (5). En el ser humano estas cepas son la causa más importante de infección del tracto urinario (UTI), en cuyo caso reciben el nombre de cepas UPEC; seguida de bacteriemias adquiridas en la comunidad y sepsis (cepas SEC). Por otra parte, constituyen una de las causas principales de meningitis en los recién nacidos (cepas NMEC) que, a menudo, acaban en muerte (6)(7). Pueden causar infecciones intraabdominales y neumonías nosocomiales y, ocasionalmente, participan en otras infecciones extraintestinales, tales como la osteomielitis, celulitis e infecciones de heridas. En los animales es de especial relevancia las elevadas pérdidas económicas que padece la industria avícola debido a las cepas que causan infecciones respiratorias y sepsis (8,9). Los animales de compañía como los perros y gatos también sufren infecciones por cepas ExPEC que pueden compartir genes de virulencia con cepas causantes de infecciones en seres humanos (10,11).

### 1.2.3.1. Factores de virulencia

Las cepas ExPEC están implicadas en un amplio espectro de enfermedades que se pueden asociar con la presencia de varios factores de virulencia, tales como diversas combinaciones de adhesinas, distintos sistemas de adquisición de hierro, producción de

toxinas y mecanismos de evasión del sistema de defensa del hospedador, entre otros. Sin embargo, aunque no se puede establecer una relación entre un factor de virulencia extraintestinal concreto y una patología específica, a partir del año 2000 surge el concepto de ExPEC, definiéndose como tal a aquellas cepas de *E. coli* con capacidad virulenta en un modelo animal o con determinados factores de virulencia que causan infecciones extraintestinales y que son distintos a los encontrados en las cepas intestinales (12,13). Cabe mencionar que en muchos estudios se engloba dentro del patotipo ExPEC a cualquier cepa de *E. coli* aislada de una infección extraintestinal, pero el criterio para discriminar las cepas ExPEC de las no-ExPEC se basa en la presencia de dos de los siguientes marcadores de virulencia: *papC* o *papAH*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA* y *kpsM II* (14).

Las cepas ExPEC poseen distintos tipos de factores de virulencia que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad, por lo que se considera que su virulencia es un fenómeno multifactorial. A continuación, se describen los siguientes factores de virulencia:

- **Adhesinas**

Estas proteínas están implicadas en la unión de la bacteria a las células epiteliales del tracto urinario, tales como:

- **Fimbria común tipo 1 (*fimH*):** presente en el genoma del 99% de los aislados de *E. coli* (15) e implicada en la adhesión e invasión de las células de la vejiga.
- **Fimbria tipo P (*papG*):** presente en la mayor parte de las cepas causantes de pielonefritis y urosepsis. Se encarga de fijarse a los receptores y colonizar el epitelio (16).
- **Fimbria tipo S:** asociada a cepas causantes de septicemias y meningitis. Muchas cepas expresan tanto la fimbria tipo S como tipo P simultáneamente (17).
- **Adhesina *afa/Dr*:** implicada en la evasión de la respuesta humoral, facilitando la invasión de las células epiteliales. Se ha asociado con cepas causantes de infecciones urinarias y septicemias (18).

En cuanto a la expresión de las fimbrias existe una regulación; de modo que en la primera fase de la infección que tiene lugar en la vejiga se expresan las de tipo 1,

---

pero en el riñón dejan de expresarse y comienzan a hacerlo las de tipo P y S. Esta regulación jerárquica parece ser esencial para el patógeno, ya que se asegura que sólo las fimbrias necesarias implicadas en la adherencia a un determinado tejido se expresan en un momento dado y, así, limitan su exposición al sistema inmune y eluden la respuesta de los anticuerpos (19).

- **Toxinas**

Actúan destruyendo las células del hospedador, para así continuar diseminándose por sus tejidos y adquirir nutrientes y otros factores necesarios durante la infección.

- **$\alpha$ -hemolisina (Hly):** presente en las cepas causantes de infecciones urinarias y sepsis, entre otras. Contribuye al suministro de hierro a la bacteria (20).
- **Sat (Secreted Autotransporter Toxin):** presente principalmente en cepas causantes de pielonefritis. Provoca efectos citopáticos sobre células del riñón y de la vejiga (21).
- **CDT (Cytolethal Distending Toxin):** presenta actividad catalítica. Se conocen 5 variantes, de las cuales la CDT-I, CDT-II y CDT-IV se han identificado en cepas ExPEC (22).
- **CNF (Cytotoxic Necrotizing Factor):** se conocen 3 tipos, de los cuales las cepas ExPEC causantes de infección urinaria y sepsis producen la variedad CNF1, junto con Hly (23,24).

- **Sideróforos**

Los sideróforos son sistemas de captación del hierro que las bacterias han desarrollado para poder crecer y sobrevivir, ya que al estar secuestrado en hemoproteínas o en proteínas transportadoras de hierro, puede llegar a convertirse en un factor limitante (25). Estos captadores de hierro se sintetizan en el citoplasma, posteriormente son secretados, captan el hierro gracias a la elevada afinidad que tienen por él, se internalizan y liberan el hierro en el citoplasma (26).

- **Proteínas involucradas en la resistencia al suero y a la fagocitosis**

Entre las proteínas involucradas en la resistencia al suero se encuentran las lipoproteínas Iss (*Increased Serum Survival*), que incrementan la supervivencia al suero

y las TraT, las cuales aumentan la resistencia de la bacteria a la acción del complemento, produciendo una disminución de la interacción de la membrana bacteriana con el complemento y, como consecuencia, reduciendo la fagocitosis (27).

También la cápsula juega un papel protector contra la fagocitosis y la actividad bactericida del suero, principalmente debido a antígenos de los grupos II y III (28).

Otro factor de virulencia que ayuda a la supervivencia de las bacterias y a la capacidad invasiva gracias a la formación de biopelículas es el *IbeA* (Invasion of Brain Endothelium) (29).

La virulencia de las cepas ExPEC ha estado clásicamente inversamente relacionada con la resistencia a antimicrobianos, de modo que las cepas uropatógenas de *E. coli* resistentes a fluorquinolonas (FQ) presentan una disminución en la expresión de los factores de virulencia en comparación con las cepas sensibles, según han constatado varios estudios. Uno de ellos lo llevaron a cabo Drews y cols., quienes estudiaron la frecuencia de la beta( $\beta$ )-hemólisis y de la expresión de *papEF* (adhesina) en una serie de aislados canadienses de *E. coli* tanto comunitarios como nosocomiales durante los años 2003-2004. Obtuvieron que la  $\beta$ -hemólisis y la expresión de *papEF*, tanto en comunitarios como en nosocomiales, eran significativamente menos frecuentes entre los aislados de *E. coli* resistentes a FQ que entre los sensibles (30). Por otro lado, Lavigne y cols. estudiaron en Francia otros factores de virulencia (*papG allele II*-variante de la adhesina P, *kpsMTK1*-variante de *kpsM* y *hlyA*-hemolisina) en aislados de *E. coli* procedentes de muestras hospitalarias, tras lo que obtuvieron que los aislados de *E. coli* sensibles a FQ estaban significativamente asociados con los factores de virulencia en comparación con los aislados resistentes a FQ (31). En otra serie europea de aislados de *E. coli*, procedentes de muestras hospitalarias recogidas durante los años 1998-1999 y 2002, Johnson y cols. estudiaron la presencia de 35 marcadores de virulencia, detectándose mayor número de estos entre los aislados sensibles a FQ que entre los resistentes, siendo estadísticamente significativa la diferencia en 3 de ellos, *fyuA* (sideróforo), *kpsMT II* y *ompT* (proteasa de la membrana externa (32).

### 1.3. Diversidad genética

Como hemos comentado anteriormente, dentro de esta especie existen diferentes grupos, pero también se pueden distinguir distintos linajes o subgrupos. Para ello se utilizan las técnicas de tipado, entre las que se encuentran las anteriores a la era molecular y las posteriores a la misma. De modo que antes de disponer de información

---

a nivel molecular, el estudio de la diversidad de *E. coli* se llevó a cabo con cepas diferenciadas mediante serotipado y perfiles metabólicos (MLEE).

### 1.3.1. Serotipado

Para diferenciar las cepas patógenas de las cepas comensales presentes en la flora microbiana normal, Kauffmann (33) desarrolló un esquema de serotipificación que actualmente tiene 174 antígenos somáticos (O1 a O181), 53 flagelares (H1 a H56) y 72 capsulares (K1 a K103). El antígeno “O” es el responsable del serogrupo; la determinación de los antígenos somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular. La serotipificación de *E. coli* requiere de un gran número de antisueros y es una técnica muy costosa, por lo que muchos laboratorios de rutina usan otros métodos de tipado.

### 1.3.2. MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*)

Este método analiza los patrones de movilidad electroforética de un grupo de enzimas metabólicas (de 15 a 30). Al haber aislados que presentan distinta movilidad enzimática, se considera que tienen diferentes versiones de la misma enzima, lo que se traduce en distintos alelos codificantes de esa enzima.

Con la incorporación de las técnicas moleculares se van superando los inconvenientes anteriormente descritos, además de conseguir mayor reproducibilidad y poder de discriminación (34). Entre dichas técnicas se encuentran: perfil plasmídico, análisis del ADN cromosómico mediante enzimas de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism* “RFPL” y *Pulse-Field Gel Electrophoresis* “PFGE”), ribotipado (análisis de los genes de ADN que codifican para ARNr 16S y 23S), técnicas de PCR (*Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*, AP-PCR y *Random-PCR*) y secuenciación del ADN (MLST) (6,35–38).

De todos ellos, cabe destacar el PFGE y el MLST por las ventajas comentadas a continuación.

### 1.3.3. PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*)

Esta técnica se basa en la digestión del ADN cromosómico con una enzima de restricción de baja frecuencia, y la posterior separación de los 10-30 fragmentos de ADN que se generan mediante electroforesis en campo pulsado. Es altamente reproducible y tiene un elevado poder de discriminación (analiza gran parte del ADN cromosómico), por lo que es un método de referencia de tipado en estudios epidemiológicos locales en



los que interesa detectar cepas implicadas en brotes. Pero esta técnica también presenta ciertas limitaciones, como: no poder intercambiar información entre laboratorios por la necesidad de estandarización, su elevado coste, laboriosidad y tiempo para obtener y analizar resultados.

#### 1.3.4. MLST (*MultiLocus Sequence Typing*)

La técnica de *MultiLocus Sequence Typing* “MLST” está basada en el MLEE y determina la secuencia de nucleótidos de ciertos genes altamente conservados (*housekeeping*). La relación de los aislados mediante MLST se basa en los polimorfismos de los dichos genes; a cada secuencia genética se le asigna un número de alelo, generándose para cada cepa un perfil alélico al que le corresponde un secuenciotipo (ST) (39).

Existen dos esquemas de MLST según los genes *housekeeping* seleccionados. Uno de ellos es el esquema de Achtman (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>), que utiliza la secuencia de 7 genes *housekeeping*: *adk* (adenilato kinasa), *fumC* (fumarato hidratasa), *gyrB* (ADN girasa), *icd* (isocitrato deshidrogenasa), *mdh* (malato deshidrogenasa), *purA* (adenilsuccinato sintetasa), y *recA* (motivo de unión ATP/GTP). El otro es el esquema de Pasteur (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/EColi.html>), el cual usa 8 genes *housekeeping*: *dinB* (DNA polimerasa), *icdA* (isocitrato deshidrogenasa), *pabB* (*p*-aminobenzoato sintasa), *polB* (polimerasa II [Pol II]), *putP* (prolin permeasa), *trpA* (subunidad A triptófano sintasa), *trpB* (subunidad B triptófano sintasa), y *uidA* ( $\beta$ -glucuronidasa).

Este método no tiene las desventajas que presenta el PFGE, ya que la información de las secuencias es comparable y transferible entre laboratorios y es altamente reproducible (40). Por el contrario, no tiene el poder discriminatorio para detectar cambios genéticos entre cepas implicadas en brotes (34) y puede ocurrir que dentro de un ST no exista homogeneidad en cuanto a las propiedades genéticas o comportamiento patotípico y que, al tiparlas, tanto aislados patogénicos como comensales o avirulentos presenten la misma combinación alélica.

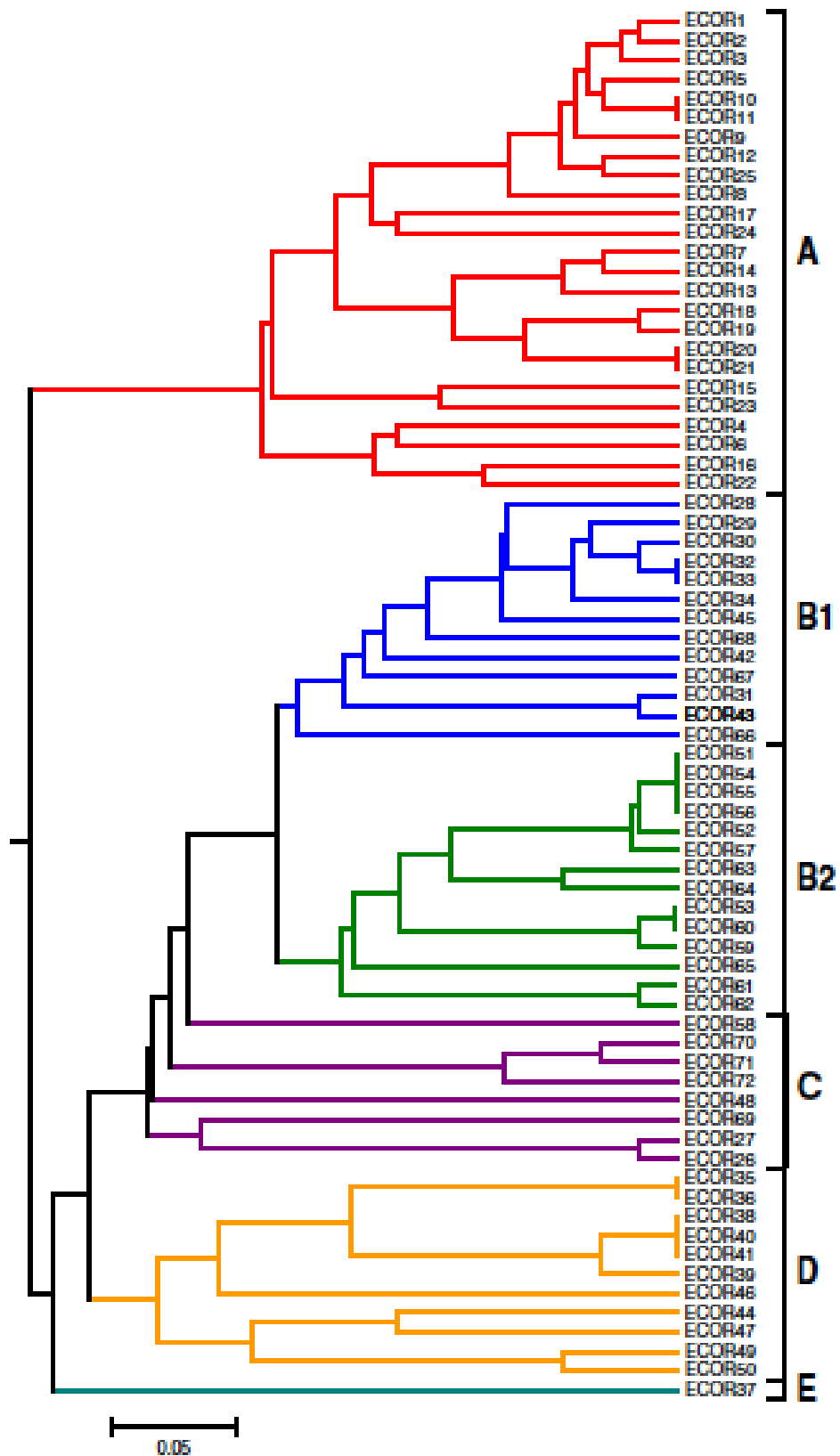
Los objetivos de estas técnicas de genotipado son distinguir los aislados patógenos de los inocuos y determinar si son aislados que pertenecen al mismo clon o a grupos clonales relacionados epidemiológicamente. Es decir, si aunque procedan de diferentes muestras, zonas geográficas y quizás diferentes fechas de aislamiento, tienen las mismas características fenotípicas y genotípicas, hace que la explicación más

---

probable para su identidad sea que proceden de un ancestro común dentro de un período de tiempo relevante (41).

## 1.4. Filogenia

En el año 1987, Ochman y Selander seleccionaron 72 cepas aisladas de especies humanas y 16 de otros mamíferos representativas de la variedad enzimática de *E. coli*. Este conjunto de cepas se denominó colección estándar de referencia (ECOR) (42). Para estudiar la relación filogenética se analizaron los clusters obtenidos mediante MLEE de 35 *loci* de las cepas de esta colección, y aplicando el método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic mean) definieron 6 grupos filogenéticos principales: A, B1, B2, C, D y E (Figura 1) (43). Un análisis posterior de 38 *loci* (44) utilizó el algoritmo de NJ (Neighbor-joining), más robusto, obteniéndose 4 grupos principales: A, B1, B2 and D, y unas pocas secuencias sin clasificar que, en ocasiones, eran referidas al grupo E. El grupo C, inicialmente definido, no se identificó en este estudio y no se usó más adelante.



**Figura 1.** Relación filogenética de los aislados de la colección ECOR tras analizarlos mediante MLEE (43).

---

Pero la información derivada mediante esta técnica no es ideal para los análisis filogenéticos, ya que puede que las secuencias enzimáticas no sean iguales aún teniendo las enzimas la misma movilidad electroforética, y el aislado sea erróneamente asignado a un filogrupo (45). De ahí, que la clasificación en filogrupos de aislados de *E. coli* estuviera reservada a colecciones estudiadas en determinados centros de referencia.

Con la introducción de las técnicas moleculares se podía asignar el filogrupo a los aislados de forma rápida y con un alto grado de concordancia con la técnica de MLEE. La primera técnica que lo permitió fue una PCR múltiple desarrollada en el año 2000 por Clermont y cols., la cual se basaba en la presencia o ausencia de tres secuencias de ADN de la parte conservada del genoma: *chuA* (necesario para el transporte del grupo hemo en *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica), *yjaA* (identificado en el genoma de *E. coli* K-12, cuya función es desconocida) y un fragmento de ADN denominado inicialmente como TSPE4.C2 (46), pero posteriormente caracterizado como un gen putativo de una esterasa lipasa (36). Pero la clasificación en filogrupos basada en unas pocas secuencias genéticas no resultó ser tan sencilla. Debido a polimorfismos nucleotídicos en las regiones de hibridación de los cebadores, hubo aislados asignados erróneamente a un determinado filogrupo. Para evitar estos errores, se diseñaron nuevas parejas de cebadores y se incluyó como control interno de *E. coli* el gen *gadA*, el cual codifica una alfa-glutamato descarboxilasa, aportando mayor sensibilidad y fiabilidad que el método de Clermont (47).

Posteriormente, utilizando la información proporcionada por el MLST, cada vez más ampliamente extendida, se han llegado a establecer 8 filogrupos en lugar de 4, de los cuales 7 pertenecen a *E. coli* en el sentido estricto (A, B1, B2, C, D, E y F) y uno corresponde a *Escherichia* grupo I (uno de los 5 clados recientemente descritos y que está hermanado con *E. coli*) (48). Para determinar todos los filogrupos, Clermont y cols. desarrollaron una PCR cuádruple con cebadores modificados para evitar polimorfismos, cuyos marcadores fueron *chuA*, *yjaA* y TspE4.C2 y *arpA*, que se utilizó como control interno y para identificar a las cepas que pertenecían al nuevo filogrupo F, anteriormente identificadas como D (49).

El conocimiento del filogrupo de un determinado aislado es importante establecerlo, ya que además de obtener información sobre su nicho ecológico y características evolutivas, está relacionado con la patogenicidad (36). Los aislados comensales pertenecen típicamente a los grupos filogenéticos A y B1 y se caracterizan por carecer de muchos de los determinantes de virulencia presentes en los aislados

patógenos (50). Los aislados intestinales se incluyen en los grupos filogenéticos A, B1, D (50) y presentan una combinación de determinantes de virulencia que da lugar a mecanismos de patogenia bien diferenciados. Los aislados ExPEC pertenecen principalmente al grupo filogenético B2, aunque también en menor medida al D (50), y tienen una serie de factores de virulencia que pueden afectar a una gran variabilidad de procesos celulares, como comentamos anteriormente (51).

Es interesante resaltar que hay estudios que relacionan la filogenia con la resistencia a antimicrobianos, tales como las FQ. En el estudio anteriormente comentado acerca de la virulencia y resistencia a quinolonas, también se encontraron diferencias entre filogenia y resistencia. En el caso de los aislados sensibles a FQ, los filogrupos A y B2 fueron más frecuentes que en los aislados resistentes (50% vs. 38%; 25% vs. 0%), mientras que en los filogrupos B1 y D eran más frecuentes entre los resistentes a FQ que entre los sensibles (38% vs. 13%; 25% vs. 13%) (32).

## **1.5. Tratamiento de las infecciones por *E. coli***

Como se ha mencionado previamente, la infección por *E. coli* es una de las etiologías más frecuentes, siendo el tratamiento antimicrobiano un aspecto importante. En infecciones no complicadas del tracto urinario por este microorganismo pueden utilizarse amoxicilina-clavulánico, cotrimoxazol, quinolonas y fosfomicina como tratamiento de elección en cepas sensibles. Si bien los aminoglucósidos no tienen un papel protagonista, se utilizan como tratamiento alternativo o en asociación con betalactámicos. En el caso de sepsis de origen urinario tanto comunitaria como nosocomial, en infecciones polimicrobianas de tejidos blandos y en infecciones intraabdominales el tratamiento de elección incluye cefalosporinas y quinolonas (52–54) fármacos que no son activos frente a la mayoría de estas cepas multirresistentes. Los carbapenémicos son de elección en el medio hospitalario para las infecciones por aislados de *E. coli* productores de BLEE que revisten gravedad, aunque no han demostrado su superioridad a otros antimicrobianos que pueden usarse una vez que se dispone del antibiograma (55).

A continuación se explican los antimicrobianos más utilizados en el tratamiento de infecciones por *E. coli*.

---

## 1.5.1. Clasificación de los antimicrobianos

### 1.5.1.1. Betalactámicos


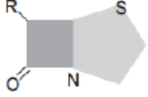
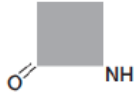
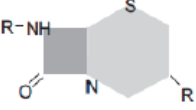
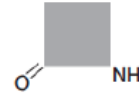
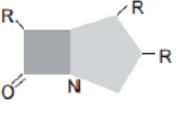
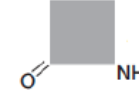
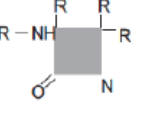

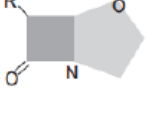
Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son agentes bactericidas que tienen en común un anillo  $\beta$ -lactámico (Figura 2). Actúan inhibiendo la síntesis del peptidoglicano, el cual es importante para mantener la integridad estructural de la pared celular bacteriana. Los  $\beta$ -lactámicos son análogos de la D-alanil-D-alanina (aminoácido terminal de las subunidades peptídicas precursoras del peptidoglicano en formación), por lo que en lugar de éste, los  $\beta$ -lactámicos se unen irreversiblemente al sitio activo de las proteínas de unión a penicilinas (penicillin binding proteins o “PBPs”) e impiden el paso final de la síntesis del peptidoglicano, la transpeptidación.

#### 1.5.1.1.1. Estructura química y clasificación de los $\beta$ -lactámicos

La presencia del anillo  $\beta$ -lactámico define químicamente a esta familia de antibióticos. No obstante, para que el  $\beta$ -lactámico sea activo, es preciso que esté unido a otros radicales (habitualmente otros anillos secundarios). Esta combinación se denomina núcleo y, junto con diversos tipos de cadenas lineales, da lugar a los diferentes grupos de antibióticos  $\beta$ -lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactamas e inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas (figura 2).

Dentro de cada grupo, pequeñas alteraciones en la estructura química son capaces de modificar las características del antibiótico, como el espectro, la afinidad por determinados receptores o la resistencia a las betalactamasas (tabla 1).

Anillo  $\beta$ -lactámico + anillo secundario = Núcleo del  $\beta$ -lactámico

Anillo $\beta$ -lactámico	Anillo secundario	Núcleo del $\beta$ -lactámico	Grupo antibiótico	
		Tiazolidínico	Ácido 6-aminopenicilánico	Penicilinas
		Dihidrothiacínico	Ácido 7 $\alpha$ -cefalosporínico	Cefalosporinas
		Pirrolínico	Carbapenemo	Carbapenemas
		Ninguno	Monobactamo	Monobactámicos
		Oxazolidínico	Clavamo/ oxapenamo	Ácido clavulánico

**Figura 2.** Estructura química de los diferentes miembros de la familia de los  $\beta$ -lactámicos. Adaptado de Suárez y cols. (56).

	Grupo	Antibiótico	Espectro de acción
<b>Penicilinas</b>	Bencilpenicilina	Penicilina G.	Espectro reducido.
	Fenoxialquilpenicilina	Penicilina V o fenoximetilpenicilina.	Espectro reducido.
	Isoxazolilpenicilinas	Oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina.	Activas frente a penicilinasas de <i>Staphylococcus</i> .
	Aminopenicilinas	Ampicilina, amoxicilina, bacampicilina, pivampicilina.	Activas frente a enterobacterias.
	Carboxipenicilinas	Ticarcilina, carbenicilina.	Activas frente a enterobacterias y <i>Pseudomonas</i> .
	Acilureidopenicilina	Piperacilina.	Activas frente a enterobacterias y <i>Pseudomonas</i> .
<b>Cefalosporinas</b>	1ª generación	Cefalotina, cefazolina, cefadroxilo, cefalexina, cefadrina.	Activas frente a grampositivos y algunas enterobacterias.
	2ª generación	Cefuroxima, cefamandol, cefonicid, cefaclor.	Mayor actividad frente a gramnegativos que grampositivos.
	Cefamicinas	Cefoxitina, cefotetán, cefmetazol.	Mayor resistencia a betalactamasas, incluidas las de espectro extendido.
	3ª generación	Cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefpodoxima, cefixima, cefoperazona.	Espectro ampliado frente a gramnegativos, incluido <i>Pseudomonas</i> .
	4ª generación	Cefepime, cefpiroma.	Amplio espectro: gran actividad frente a grampositivos y gramnegativos.
<b>Carbapenemas</b>		Imipenem, ertapenem, meropenem, doripenem.	Resistencia a betalactamasas, incluidas las de espectro extendido.
<b>Monobactamas</b>		Aztreonam, carumonam.	Resistencia a betalactamasas, especialmente de <i>Pseudomonas</i> .
<b>Inhibidores de β-lactamasas</b>		Ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam.	Asociados con betalactámicos restauran su actividad.

**Tabla 1.** Clasificación de los antibióticos β-lactámicos.



### 1.5.1.2. Quinolonas

Las quinolonas son antimicrobianos bactericidas cuya estructura química se basa en el anillo 4-oxo-quinoleína. Actúan inhibiendo a la ADN girasa y a la topoisomerasa IV, con lo cual impiden la síntesis del ADN.

Sobre el anillo se han hecho múltiples modificaciones para obtener moléculas con un mayor espectro de acción y mejores características farmacocinéticas, siendo las más notables las adiciones de un átomo de flúor en la posición 6 y de un grupo piperacínico o metil-piperacínico en la posición 7. Los compuestos obtenidos se denominaron fluoroquinolonas, entre las que cabe destacar el ciprofloxacino.

### 1.5.1.3. Aminoglicósidos

Estos antimicrobianos son agentes bactericidas cuya estructura química consta de un anillo aminociclitol (varía según el antimicrobiano) con dos o más azúcares. El mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de proteínas. Se pueden clasificar en naturales, dentro de las cuales se encuentran la tobramicina, estreptomina y gentamicina, entre otros; y los semisintéticos, entre los que destaca la amikacina.

### 1.5.1.4. Cotrimoxazol

Este antimicrobiano resulta de la asociación de trimetoprim-sulfametoxazol, lo que determina que se comporte como bactericida. Actúa bloqueando la síntesis del ácido fólico en dos etapas, lo que supone una potenciación de la acción.

### 1.5.1.5. Fosfomicina

Este antimicrobiano se caracteriza por la presencia de un anillo epóxido y un grupo fosfórico. Se comporta como un análogo del fosfoenolpiruvato, impidiendo la formación del N-acetil-murámico y, con ello, la síntesis de la pared bacteriana.

---

## 1.6. Resistencia a antimicrobianos en *E. coli*

En los últimos 15-20 años, el manejo terapéutico de las infecciones por *E. coli* se ha visto dificultado por el aumento de los mecanismos de resistencia que presenta el microorganismo. Concretamente, la resistencia a FQ y al trimetoprim-sulfametoxazol limita las opciones terapéuticas en los pacientes comunitarios, mientras que la resistencia a las cefalosporinas lo hace en el caso de los pacientes hospitalarios.

Los aislados de *E. coli* pueden presentar resistencia a un antimicrobiano o a varios, lo cual conllevaría a un estado de multiresistencia. Por otro lado, la resistencia puede ser natural (intrínseca) o adquirida. La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano y esta situación no es variable. La resistencia adquirida sí es variable y puede originarse por la adquisición de determinantes de resistencia a través de elementos móviles, o por la aparición de mutaciones.

A continuación, se explican los diferentes mecanismos de resistencia de *E. coli* a los principales grupos de antimicrobianos:  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas.

### 1.6.1. Betalactámicos

Existen numerosos mecanismos por los que las bacterias pueden desarrollar resistencia a los  $\beta$ -lactámicos, entre los que se encuentran:

1. Aquellos que impiden que el  $\beta$ -lactámico llegue a la diana, tales como alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa y bombas de expulsión.
2. Aquellos en los que se modifican las dianas. Los cambios a nivel de las PBPs implican que los  $\beta$ -lactámicos pierdan afinidad por ellas, con la consiguiente disminución de su actividad. Aunque este mecanismo afecta fundamentalmente a grampositivos.
3. Aquellos en los que existe la inactivación enzimática por producción de  $\beta$ -lactamasas.

De todos estos mecanismos, el más importante, por su frecuencia y eficacia en aislados de *E. coli*, es la producción de  $\beta$ -lactamasas.

### 1.6.1.1. $\beta$ -lactamasas

Las  $\beta$ -lactamasas pueden ser cromosómicas o plasmídicas. En el primer caso pueden ser tanto constitutivas como inducibles; si bien, las enzimas plasmídicas sólo son constitutivas, cuyo grado de producción está en relación con el número de copias del plásmido (57,58). La resistencia que originan es intrínseca o adquirida (mutación) en el caso de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas, y adquirida, si la  $\beta$ -lactamasa es plasmídica.

#### 1.6.1.1.1. Mecanismos de acción

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico antes de que el antibiótico llegue al punto de unión con las PBP. Se unen a los  $\beta$ -lactámicos mediante un enlace no covalente, tras lo cual tiene lugar una acetilación entre el grupo éster del anillo  $\beta$ -lactámico y el grupo hidroxilo libre del centro activo de la enzima. Finalmente, la enzima que se encuentra activa es liberada, y el antibiótico inactivo (59).

#### 1.6.1.1.2. Clasificación

Las  $\beta$ -lactamasas se han clasificado utilizando diferentes criterios, aunque principalmente se han basado en su estructura molecular (clasificación de Ambler) y en sus características enzimáticas (clasificación según Bush, Jacoby y Medeiros) (tabla 2):

- I. La clasificación molecular de Ambler (60) divide a las  $\beta$ -lactamasas en cuatro clases (A, B, C y D), atendiendo a la estructura de la proteína.

Las enzimas de los grupos A, C y D son serin- $\beta$ -lactamasas, que contienen una serina en su centro activo. Las del grupo B son metalo- $\beta$ -lactamasas, enzimas que requieren para su acción la unión del  $Zn^{+2}$  a su centro activo.

- II. La clasificación funcional propuesta por Bush, Jacoby y Medeiros en 1995, y actualizada en 2009 (61,62), establece diferentes grupos según su sustrato y el perfil de inhibición por inhibidores de  $\beta$ -lactamasas:

---

El **grupo 1** (clase C de Ambler o de tipo AmpC) incluye enzimas que pueden localizarse en el cromosoma o en plásmidos. Las cromosómicas (expresión inducible) hidrolizan cefalosporinas de 1ª y 2ª generación (incluidas las cefamicinas) y no son inhibidas por el ácido clavulánico o tazobactam, pero si hay una hiperproducción de dicha enzima, el espectro hidrolítico aumenta y llegan a afectar a las cefalosporinas de 3ª generación; aunque frente a cefepime son mucho menos activas y carecen de actividad frente a carbapenemas. Este perfil de actividad las hace indistinguibles de las AmpC plasmídicas (expresión constitutiva), hecho que dificulta su seguimiento epidemiológico.

Se incluyen en este grupo las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas inducibles de *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* spp., *M. morgani*, *P. aeruginosa*, y la cromosómica constitutiva de *E. coli*. También pertenecen a este grupo AmpC plasmídicas descritas en *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *S. enterica*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *M. morgani* y *E. aerogenes*.

El **grupo 2** (clases A y D de Ambler) se inhibe por el ácido clavulánico y está compuesto por 12 subgrupos, de los cuales cabe destacar el 2b (incluye  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro) y el 2be (incluye las Beta-Lactamasas de Espectro Extendido "BLEE"). Las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro confieren resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera generación, y las BLEE a penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda generación (excepto cefamicinas), de tercera y cuarta (cefalosporinas de espectro extendido) y monobactámicos. Ambos grupos de enzimas se inhiben por el ácido clavulánico/tazobactam.

Bush-Jacoby (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Clase Molecular (subclase)	Centro activo	Sustrato preferencial	Inhibida por		Enzimas representativas
					CLA/TAZ	EDTA	
1	1	C	Serina	Cefalosporinas	No	No	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI	C	Serina	Cefalosporinas	No	No	GC1, CMY-37
2a	2 <sup>a</sup>	A		Penicilinas	Sí	No	PC1
2b	2b	A		Penicilinas, Cefalosporinas de 1 <sup>a</sup> G.	Sí	No	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Serina	Cefalosporinas Espectro Extendido (3 <sup>a</sup> y 4 <sup>a</sup> generación), monobactámicos	Sí	No	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Serina	Penicilinas	No	No	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Serina	Cefalosporinas Espectro Extendido (3 <sup>a</sup> y 4 <sup>a</sup> generación), monobactámicos	No	No	TEM-50
2c	2c	A	Serina	Carbenicilina	Sí	No	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Serina	Carbenicilina, cefepime	Sí	No	RTG-4
2df	NI	D	Serina	Carbapenemas	Variable	No	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Serina	Cefalosporinas Espectro Extendido(3 <sup>a</sup> y 4 <sup>a</sup> generación)	Sí	No	CepA
2f	2f	A	Serina	Carbapenemas	Variable	No	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Zinc	Carbapenemas	No	Sí	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B (B3)	Zinc				L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Zinc	Carbapenemas	No	Sí	CphA, Sfh-1
NI	4	Desconocido	Serina				Enzima cromosómica de <i>B. cepacia</i>

**Tabla 2.** Clasificación de las  $\beta$ -lactamasas según su grupo funcional (Bush, Jacoby y Medeiros) y clase molecular (Ambler). CLA: ácido clavulánico; TAZ: tazobactam. NI: No Incluido.

El **grupo 3** (clase B de Ambler) incluye metalo-β-lactamasas. Estas enzimas se inhiben por agentes quelantes como el EDTA, pero no por el ácido clavulánico o tazobactam.

El **grupo 4**, incluido en la clasificación inicial, no aparece en la actualización del año 2009. La mayoría de enzimas de este grupo no están completamente caracterizadas y podrían ser clasificadas en los grupos anteriores.

Recientemente, Giske y han propuesto una clasificación para facilitar el control epidemiológico de las BLEE (Tabla 3), de modo que se establecen tres grupos con diferentes subclases cada uno, de acuerdo con sus características fenotípicas. El grupo BLEE<sub>A</sub> agrupa a las β-lactamasas de clase 2be, donde se encuentran las BLEE más prevalentes (TEM, SHV y CTX-M). El grupo BLEE<sub>M</sub> engloba a las AmpC plasmídicas y las BLEE tipo OXA, entre otras. El grupo BLEE<sub>CARBA</sub> está compuesto por carbapenemasas (63).

Betalactamasas con actividad hidrolítica frente a cefalosporinas de espectro extendido y carbapenemas			
	BLEE <sub>A</sub>	BLEE <sub>M</sub>	BLEE <sub>CARBA</sub>
<b>Tipos de betalactamasas</b>	BLEE <sub>A</sub> Alta prevalencia CTX-M, TEM, SHV, VEB, PER	BLEE <sub>M-C</sub> (AmpC plasmídicas) CMY, FOX, MIR, MOX, DHA, LAT, BIL, ACT, ACC	BLEE <sub>CARBA-A</sub> KPC, GES-2, -4, -5, -6, -8, NMC, SME, IMI-1, -2
	BLEE <sub>A</sub> Baja prevalencia GES-1,-3, -7, -9, SFO-1, BES-1, BEL-1, TLA, IBC, CMT <sup>a</sup>	BLEE <sub>M-D</sub> (OXA-BLEE) Grupo OXA-10 Grupo OXA-13 Grupo OXA-2 OXA-18, OXA-45	BLEE <sub>CARBA-B</sub> (MBL) IMP, VIM, SMP-1, GIM-1, SIM-1, AIM-1 BLEE <sub>CARBA-D</sub> (OXA-carbapenemasas) Grupo OXA-23, grupo OXA-24, OXA-48 <sup>b</sup> , Grupo OXA-58
<b>Características</b>	Resistentes a cefalosporinas de espectro extendido. Sinergia con ácido clavulánico.	Resistentes a cefalosporinas de espectro extendido. Detección fenotípica (BLEE <sub>M-C</sub> ) y genotípica (BLEE <sub>M-D</sub> )	Resistentes a cefalosporinas de espectro extendido y a menos a una carbapenema. BLEE <sub>CARBA</sub> detectadas con métodos fenotípicos y/o genotípicos.

**Tabla 3.** Clasificación de BLEE propuesta por Giske y (Adaptado de Giske y 2009).

a) Resistente a ácido clavulánico. b) Los aislados productores de OXA-48 pueden presentar sensibilidad *in vitro* a las cefalosporinas.

---

#### 1.6.1.1.2.1. Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

Las BLEE son enzimas que derivan de las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro que, tras sufrir mutaciones en el centro activo (el cambio de uno o más aminoácidos implica la apertura del sitio activo de la enzima y un mayor acoplamiento de la cadena lateral del  $\beta$ -lactámico), incrementan su actividad, llegando a hidrolizar no sólo penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación, sino también de tercera y cuarta (64). Estas dos últimas generaciones de cefalosporinas se introdujeron en la práctica clínica en los años 80 debido al incremento de microorganismos productores de  $\beta$ -lactamasas, pero debido a que presentaban menor nefrotoxicidad que otros antimicrobianos (aminoglucósidos y polimixinas), hubo un uso excesivo y esto, según algunos autores, hizo que aumentara la prevalencia de las BLEE (65). La mayoría de estas enzimas son producidas por bacilos gramnegativos, principalmente *E. coli* y *K. pneumoniae*, aunque también pueden identificarse en otras enterobacterias y bacilos gramnegativos no fermentadores.

Las BLEE incluyen enzimas de la clase A de Ambler (grupo 2be de Bush) y enzimas de la familia OXA de la clase D (grupo 2de) (Tabla 2). El origen de estas enzimas es generalmente plasmídico, aunque se han encontrado formando parte del cromosoma bacteriano, como en el caso de CTX-M-9 y CTX-M-15 (66,67).

Desde que se describiera la primera BLEE en 1983, el número de variantes ha ido aumentando hasta alcanzar hoy día aproximadamente 200, lo cual demuestra una rápida evolución (68).

##### 1.6.1.1.2.1.1. BLEE grupo TEM

Las BLEE del grupo TEM derivan de las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro, TEM-1 y TEM-2, tras modificaciones en la secuencia de aminoácidos que, como se ha comentado anteriormente, conlleva cambios en la estabilidad de la enzima y en el perfil hidrolítico (69).

En 1987 se aisló la primera  $\beta$ -lactamasa con patrón fenotípico de BLEE, TEM-3 (denominada originalmente CTX-1 por su capacidad de hidrolizar la cefotaxima), la cual se originó a partir de TEM-2 tras dos sustituciones aminoacídicas (70). Aquellas sustituciones más destacables responsables del fenotipo BLEE, con mayor capacidad de hidrólisis de

---

ceftazidima que cefotaxima, se producen en las posiciones 104 y 240 (glutamato por lisina), en la 164 (arginina por serina o histidina) y en la 238 (glicina por serina).

Algunas enzimas como TEM-7 y TEM-12 no cumplen el perfil hidrolítico rigurosamente, sino que las tasas de hidrólisis para ceftazidima son mucho más elevadas en comparación con TEM-1 y TEM-2 y, por tanto, su CMI también aumenta. De ahí, que se hayan considerado BLEE y estén clasificadas dentro del grupo 2be (61).

Se han descrito más de 180 variantes de BLEE de la familia TEM, entre las que se incluyen las IRT (Inhibitor- Resistant TEM), es decir, enzimas de amplio espectro resistentes a los inhibidores, pero sensibles a cefalosporinas de 3ª generación, y las CMT (Complex Mutant TEM), que combinan los perfiles de BLEE y de IRT. La mayoría de las enzimas de este grupo son ceftazidimasas y unas pocas son cefotaximasas. Son producidas principalmente por *E. coli* y *K. pneumoniae*, aunque también por *E. aerogenes*, *M. morgani*, *P. mirabilis*, etc.

#### 1.6.1.1.2.1.2. BLEE grupo SHV

Las enzimas BLEE del grupo SHV derivan de la  $\beta$ -lactamasa de amplio espectro SHV-1 (sulfhídrico variable), la cual fue identificada por primera vez en el cromosoma de *K. pneumoniae* (71). También pueden derivar de la variante alélica SHV-1-2ª (SHV-11), tras sustituciones en aminoácidos críticos del centro activo de la enzima que suponen una ampliación del espectro.

En 1983 se detectó por primera vez una BLEE en un aislado de *Klebsiella ozaenae* con mayor actividad hidrolítica frente a cefotaxima que a ceftazidima (72); la enzima, denominada SHV-2, derivaba de SHV-1 tras la mutación Ser238Gly. Otra sustitución importante es la que tiene lugar en el aminoácido 240, como ocurre con las enzimas SHV-5 y SHV-12, cuyo cambio Glu240Lys incrementa la actividad hidrolítica frente a ceftazidima y aztreonam.

Hasta la fecha existen más de 130 variantes de  $\beta$ -lactamasas SHV, la mayoría de espectro extendido ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)) y con mayor capacidad de hidrolizar la ceftazidima que la cefotaxima. Aunque se han aislado principalmente en especies de *Klebsiella*, también se han descrito en *E. coli*, *C. diversus* y *P. aeruginosa* (73).



#### 1.6.1.1.2.1.3. BLEE grupo CTX-M

Todas las enzimas de este grupo son BLEE y deben su nombre a la preferencia que muestran para hidrolizar cefotaxima y ceftriaxona frente a ceftazidima.

En 1986 se describió en Japón un aislado de *E. coli* resistente a cefotaxima en las heces de un perro de laboratorio y productora de  $\beta$ -lactamasa FEC-1 y de codificación plasmídica (74). En el año 1989 se aisló por primera vez una enzima similar a FEC-1 en un aislado de *E. coli* procedente de un exudado ótico de un recién nacido y que fue denominada CTX-M-1, por su elevada actividad hidrolítica frente a la cefotaxima y por haberse aislado en Munich (75). Simultáneamente en Argentina se describió la enzima CTX-M-2 en cepas de *Salmonella typhimurium* (75). En 1994 se detectó el primer aislado de *E. coli* productor de CTX-M-9 en Francia, en 1996 el primer aislado productor de CTX-M-8 en Brasil (76) y en 1999 el primer aislado de CTX-M-15 en la India (77).

Las enzimas de esta familia se clasifican en 5 grupos (Tabla 4) en base a sus identidades aminoacídicas. Los miembros de un mismo grupo comparten más del 94% de dicha identidad y menos del 90% aquellos que pertenecen a distintos grupos (78).

Estas enzimas están estrechamente relacionadas con las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de distintas especies del género *Kluyvera*, ya que existe una alta homología (>90%) entre los genes cromosómicos de *Kluyvera* y algunos genes *bla*<sub>CTX-M</sub>. De ahí, que se piense que estos genes hayan saltado del cromosoma para integrarse en plásmidos y diseminarse y que, por tanto, estas varias especies de este género sean el origen de las enzimas (78). El grupo CTX-M-1 deriva de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de *K. ascorbata* (79) y el grupo 2 de *K. cryocescens*, mientras que 8 y 9 lo hacen de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de *Kluyvera georgiana* (80). El origen del grupo CTX-M-25 no se conoce con precisión todavía, pero pudiera estar en otros miembros del género *Kluyvera* (80,81).

Grupo	Enzimas
CTX-M-1	CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -22, -23, -28, -29, -30, -32, -33, -34, -36, -37, -42 y -54.
CTX-M-2	CTX-M-2, -4, -4L, -5, -6, -7, -20, -31, -35, -43 y -44.
CTX-M-8	CTX-M-8 y -40.
CTX-M-9	CTX-M-9, -13, -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 4.** Clasificación filogenética de las enzimas CTX-M.

Hay sustituciones aminoacídicas tales como Gly240Asp y Pro167Ser que producen un incremento en la actividad frente a ceftazidima, como sucede en CTX-M-15 y CTX-M-32 con la primera sustitución, y en CTX-M-19 con la segunda (82,83). Otros cambios aminoacídicos que juegan también un papel importante son Asn276Arg, el cual confiere bajo nivel de resistencia a cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam, y Ser237Ala, el cual induce una disminución de la actividad hidrolítica frente a cefotaxima (84).

Actualmente hay descritas más de 100 tipos de CTX-M y constituyen el tipo de BLEE más frecuente a nivel mundial, producidas principalmente por *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. typhimurium*.

#### 1.6.1.1.2.1.4. Otras BLEE

Las BLEE tipo OXA se caracterizan por tener un perfil hidrolítico diferente a las anteriormente descritas; presentan gran actividad hidrolítica frente a oxacilina, ampicilina y cefalotina, y apenas son inhibidas por el ácido clavulánico. La primera OXA con espectro BLEE (OXA-11) deriva de OXA-10 y fue descrita a partir de un aislado de *P. aeruginosa* procedente de una muestra de sangre de un paciente de Turquía (85). En la actualidad hay descritas 11 variantes de OXA con perfil de BLEE ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)). Se han identificado mayoritariamente en *P. aeruginosa* y en *A. baumannii*, y en menor cuantía en diferentes especies de enterobacterias (86).

Otros grupos de BLEE son los pertenecientes a las familias PER, VEB y GES, las cuales tienen un perfil hidrolítico semejante a otras BLEE de clase A y, al igual que las OXA, se han identificado principalmente en bacilos gramnegativos no fermentadores. Aunque también se han descrito aislados de enterobacterias, como es el caso de la primera enzima tipo VEB por parte de un aislado de *E. coli* en el año 1996 (87), o el caso de la primera enzima tipo GES, la cual se describió a partir de un aislado de *K. pneumoniae* en Francia (88). En la actualidad se han descrito 7 variantes de enzimas tipo VEB y 16 de GES ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)), las cuales han sido identificadas en países de distintos continentes como Argentina, Brasil, China, Corea, Japón, Francia, Grecia, Portugal y Sudáfrica (86,89,90). Las principales especies implicadas en la diseminación de estas BLEE son *P. aeruginosa*, *E. coli* y *K. pneumoniae*.

Otras BLEE descritas de manera esporádica (menor prevalencia) en diferentes países son SFO, TLA, BEL y BES (86,91–94).

#### 1.6.1.1.2.2. AmpC

Las betalactamasas de la clase molecular C de Ambler (grupo 1 de Bush) se caracterizan por su espectro de hidrólisis: degradan cefalosporinas de primera y de segunda (incluidas las cefamicinas) y, en menor medida, las de tercera generación. Las de cuarta generación y los carbapenémicos se ven poco afectadas por su perfil de inhibición. Pero si existe una hiperproducción de la enzima, el espectro de hidrólisis se amplía y afecta tanto a cefalosporinas de 3ª como de 4ª generación. Por otro lado, las carbapenemas se pueden ver afectadas en caso de que haya una variante de estas enzimas, las denominadas AmpC de espectro extendido (*Extended Spectrum AmpC  $\beta$ -lactamasas* “ESAC”) (95).

La expresión constitutiva de una  $\beta$ -lactamasa de tipo AmpC puede a menudo enmascarar la presencia de una BLEE. Fenotípicamente podemos diferenciarlas porque AmpC es resistente a inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el ácido clavulánico y a la cefoxitina, pero es sensible a cloxacilina y cefepime. Típicamente están codificadas en el cromosoma de bacterias gramnegativas, aunque también pueden localizarse en plásmidos (96). Desde el punto de vista epidemiológico, las AmpC plasmídicas tienen mayor relevancia que las AmpC cromosómicas debido a su capacidad para movilizarse, y se

---

pueden transferir tanto en el ambiente nosocomial, donde tiene un claro potencial epidémico, como en la comunidad.

La incidencia de estas enzimas varía de un país a otro. En Estados Unidos se ha descrito un 8,5% de AmpC plasmídicas en *K. pneumoniae*, 6,9% en *K. oxytoca* y 4% en *E. coli* (97). En Canadá se ha documentado la presencia de CMY-2 en un 0,16% de cepas de *E. coli* (98).

En España se describe la primera AmpC plasmídica en el 2000, en un aislado de *E. coli* productor de FOX-4 (99). En los hospitales de Santa Creu y Sant Pau, la incidencia de AmpC plasmídicas en *E. coli* ha ido incrementando, de un 0,04% en 1999 a 1,12% en 2007 (100).

#### 1.6.1.1.2.3. Carbapenemasas

Estas enzimas se agrupan en diferentes clases de Ambler que se corresponden con diferentes grupos funcionales de la clasificación de Bush (Tabla 3). En enterobacterias las más relevantes son IMI y KPC de la clase A, IMP y VIM de clase B y OXA de clase D.

Las carbapenemasas de clase A hidrolizan todos los betalactámicos, aunque tienen baja tasa de hidrólisis de la cefoxitina y se inhiben por el ácido borónico. Las carbapenemasas de clase B tienen un perfil hidrolítico que incluye todos los betalactámicos salvo el aztreonam, no se inhiben por el ácido clavulánico o tazobactam ni borónico, pero sí por agentes quelantes como el EDTA, el ácido dipicolínico o fenantrolina (101,102). Las de clase D hidrolizan las penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, pero las de tercera y cuarta no se ven afectadas; las carbapenemasas se ven afectadas en muy bajo grado.

Se han descrito aislados de *E. coli* productores de carbapenemasas en todo el mundo. En un estudio multinacional en el que participaron 455 hospitales de 36 países europeos durante los años 2013-2014, se detectaron aislados productores de enzimas de todas las clases, aunque los países con mayor prevalencia fueron los del Mediterráneo y los Balcanes (103). En España también se han detectado aislados de *E. coli* productores de carbapenemasas de todas las clases, principalmente de OXA-48. Durante los años 2012-2014 se obtuvo que el 71,9% de los aislados de *E. coli* producían OXA-48, el 22,3% VIM-1, el 3,3% KPC-2, el 1,7% NDM y el 0,8 IMP-22 (104).

#### 1.6.1.1.3. Corresistencia en aislados productores de BLEE

Un rasgo muy importante de los aislados de *E. coli* productores de BLEE es la frecuente corresistencia a otras familias de antimicrobianos como fluoroquinolonas, aminoglucósidos y trimetoprim-sulfametoxazol. Esto plantea un gran problema clínico debido a la escasez de alternativas terapéuticas (65). La resistencia a estos antibióticos puede deberse a mutaciones, reorganizaciones cromosómicas o a la presencia de genes plasmídicos de resistencia, los cuales pueden ser vehiculizados por el mismo plásmido que contiene el gen *bla* o por otro diferente.

Son varios los estudios que han puesto de manifiesto el aumento de aislados productores de BLEE multirresistentes. Según el programa Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC), a nivel de Europa el 2,1% de los aislados de *E. coli* eran productores de BLEE en el año 1997, si bien en el año 2004 ascendió hasta el 10,8% (105). A nivel nacional sucede lo mismo, según el estudio llevado a cabo por el GEIH en los años 2000 y 2006, la prevalencia de aislados de *E. coli* BLEE aumentó del 0,5% en el año 2000 al 4,04% en el año 2006 (106,107). En Sevilla, en un estudio realizado en el Hospital Universitario Virgen Macarena se obtuvieron resultados concordantes con lo que sucedía en el resto de la geografía. En el año 1995 el 0,31% de los aislados de *E. coli* era productor de BLEE, si bien en el año 2003 fue el 4,8% (108).

En otros trabajos también se resalta el hecho de que los aislados productores de BLEE son más resistentes a otras familias de antimicrobianos que los no productores. Uno de ellos se llevó a cabo en Israel durante los años 2000-2003, en el que se analizó la sensibilidad de 312 enterobacterias productoras de BLEE y de 1216 no productoras de BLEE. Los aislados productores de BLEE fueron sensibles a la gentamicina en el 25% de los casos, al trimetoprim-sulfametoxazol en el 30%, al ciprofloxacino en el 41% y a la piperacilina-tazobactam en el 60%. En el caso de los aislados no productores de BLEE los porcentajes de sensibilidad a los antimicrobianos anteriormente citados estaban en torno al 60% (109).

##### 1.6.1.1.3.1. Asociación de aislados productores de BLEE y resistencia a quinolonas

La resistencia a quinolonas puede deberse a varios mecanismos: modificación de la diana por mutaciones en los genes de la girasa (*gyrA* y *gyrB*) y de la topoisomerasa IV

---

(*parC*), lo cual da lugar a resistencia de alto nivel (110,111); en menor frecuencia, debido a la presencia de genes de resistencia mediados por plásmidos (Plasmid Mediated Quinolone Resistance o PMQR), los cuales originan una resistencia de bajo nivel. Entre dichos genes se encuentran los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA* y *aac(6')-Ib-cr*, codificando este último una enzima que afecta no sólo a los aminoglucósidos, sino también al ciprofloxacino (112). Otros mecanismos que contribuyen a la resistencia son la disminución de la permeabilidad por pérdida o modificación de las porinas y los sistemas de expulsión activa, tanto de localización cromosómica como plasmídica.

Respecto a la asociación de enterobacterias productoras de BLEE con resistencia a ciprofloxacino se confirma, en una serie de 983 aislados de origen comunitario procedentes de Europa, Asia y Norte América, que el 90% de los aislados eran *E. coli* productores de BLEE y el 76% de estos aislados era resistente a ciprofloxacino (113).

En España las tasas de resistencias en *E. coli* a quinolonas son semejantes a las citadas anteriormente. En dos estudios llevados a cabo en los años 2002-2003 y 2006 en varios hospitales a nivel nacional se hallaron, entre los aislados productores de BLEE, tasas de resistencia a ciprofloxacino del 64% y 68,6%, respectivamente (114,115). Por otro lado, en el año 2006 Briales y cols. estudian la prevalencia de los genes plasmídicos en una serie de aislados de *E. coli* productores de BLEE procedentes de 44 hospitales nacionales, detectando en el 1,1% de todos los aislados genes *qnr* y en el 12,7% *aac(6')-Ib-cr*. Tanto los aislados con *qnr* como con *aac(6')-Ib-cr* con baja resistencia a ciprofloxacino no presentaban mutaciones cromosómicas, mientras que aquellos con alto nivel de resistencia tenían además 1 ó 2 mutaciones en *gyrA* y *parC* (116).

#### 1.6.1.1.3.2. Asociación de aislados productores de BLEE y resistencia a aminoglucósidos

El principal mecanismo de resistencia a aminoglucósidos es la producción de enzimas modificantes de aminoglicósidos (acetiltransferasas, nucleotidiltransferasas y fosfotransferasas). Los genes que codifican estas enzimas suelen formar parte de integrones y transposones. También se han descrito alteraciones en la dianas a nivel ribosómico o por metilación del ARNr16S, mediados en este último caso por genes que codifican las metilasas de tipo *arm* o *rmt* (117–119).

En diversos trabajos se ha descrito la relación entre los diferentes mecanismos de resistencia a aminoglucósidos y la producción de BLEE en enterobacterias. En nuestro país uno de los primeros estudios sobre enzimas modificadoras de aminoglucósidos en aislados productores de BLEE se realizó en 1992. Se analizaron 120 enterobacterias procedentes de dos centros hospitalarios de Madrid y se observó una tasa alta de resistencia a aminoglucósidos: el 84% para gentamicina y tobramicina, el 78% para netilmicina, el 65% para estreptomina y kanamicina y el 19% para amikacina. Se detectaron enzimas modificadoras de aminoglucósidos en el 98,7% y el 100% de los aislados productores de BLEE del grupo SHV y TEM, respectivamente (120).

Por otra parte, hay estudios que describen la asociación entre metilasas de aminoglucósidos del ARNr 16S y BLEE. En un trabajo llevado a cabo en dos hospitales belgas para conocer la resistencia de alto nivel a aminoglucósidos debido a dichas metilasas, se obtuvo que de los 19 aislados de enterobacterias (*K. pneumoniae* y *E. coli*) en los que se detectó *armA*, 17 (89,4%) producían CTX-M-3 (121).

A pesar de que el aumento de la prevalencia de aislados productores de BLEE en los últimos años debería llevar acompañado de forma lógica un aumento del nivel de resistencia a aminoglucósidos, esto no parece haber cambiado en las últimas décadas. En 1997, en el programa de vigilancia SENTRY realizado en Estados Unidos, Canadá, América del Sur y Europa se encontró que la mayoría de las bacterias gramnegativas eran sensibles a los aminoglucósidos, encontrándose unos porcentajes de sensibilidad entre 96% y 100% para amikacina, 90% y 96% para gentamicina, y entre 94 y 97% para tobramicina (122). Porcentajes similares se describieron dos años después en el estudio de vigilancia europeo SENTRY realizado sólo en enterobacterias: 97% para amikacina, 98% para gentamicina y en torno al 90% para tobramicina (123). Estos porcentajes son similares a los hallados para amikacina (90%) y superiores a los de tobramicina y gentamicina (66%) en un estudio multicéntrico realizado en España, en el que participaron 40 hospitales en el año 2000 (124).

## **1.7. Evolución reciente de la epidemiología de las BLEE**

La infección causada por enterobacterias productoras de BLEE era un fenómeno que, hasta hace pocos años, estaba relacionado con pacientes que presentaban diversas patologías debilitantes e ingresaban en centros sanitarios. Desde que en 1983 se descubrió en Alemania el primer aislado productor de BLEE (SHV-2), se empezaron a detectar en

---

diferentes áreas del mundo y, cada vez con más frecuencia, enterobacterias resistentes a  $\beta$ -lactámicos y también a otros grupos de antibióticos relacionadas con infecciones comunitarias (125). Vamos a ver a continuación cómo era la situación antes del año 2000 y cómo cambió a partir de entonces.

### 1.7.1. Situación hasta el año 2000

Hasta finales de los años 90 *K. pneumoniae* era la principal enterobacteria implicada en la producción de estas enzimas, principalmente de los grupos TEM y SHV (96). También era la más involucrada en brotes nosocomiales, sobre todo en unidades de cuidados intensivos (UCI) y Pediatría. Dichos brotes se caracterizaban por estar producidos por cepas clonalmente relacionadas. El primer brote documentado fue descrito en Francia en 1986 debido a que varias cepas diseminaron desde las Unidades de Cuidados Intensivos hasta otras salas hospitalarias, llegando a infectar al 15,7% de los pacientes (126). En este mismo país se produjo durante los años 1987-89 la diseminación clonal de *K. pneumoniae* productor de SHV-4 en 14 hospitales franceses (127). Otra enterobacteria involucrada en brotes nosocomiales era *E. aerogenes*, de la cual hay descrito uno en el año 1993 debido a una cepa productora de TEM-24. Llegó a afectar a UCI, a otra sala del mismo hospital y a un geriátrico localizado dentro de la misma ciudad. Pero también se detectaron otras enterobacterias productoras de TEM-24, lo cual pudo ser debido a la diseminación plasmídica de BLEE desde *E. aerogenes* (128).

De forma paralela a lo que estaba ocurriendo en Europa, se describieron varios brotes de enterobacterias productoras de diferentes tipos de BLEE en EEUU. Durante los años 1988-90 tuvo lugar un brote por *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de TEM-26 en la unidad de oncología pediátrica de un Hospital de California (129). También en Chicago se produjo un brote durante los años 1990-1992 debido a dos cepas productoras de TEM-10; una cepa de *K. pneumoniae*, la cual se expandió en el ámbito hospitalario, y otra cepa de *E. coli* que lo hizo en residencias (130).

A nivel nacional se describió a finales de los años 80 la primera epidemia, la cual tuvo lugar en un hospital de Madrid debido a varias enterobacterias productoras de SHV-2, de las cuales la más frecuente fue *K. pneumoniae* (131). A partir de entonces, se han comunicado diversos brotes hospitalarios, de los cuales uno de los más importantes descrito hasta el momento tuvo lugar entre los años 1993-1995 en el Hospital de Bellvitge. Este brote se debió a la diseminación clonal de una cepa de *K. pneumoniae* productora de



dos BLEE del grupo SHV y llegó a afectar a 150 pacientes, de los cuales el 70% estaba ingresado en UCI (132).

### 1.7.2. Situación a partir del año 2000

Pero a finales de los 90 y principios del año 2000 se produjo un cambio epidemiológico muy significativo. Emergió *E. coli* como principal especie productora de BLEE, llegando a superar a *K. pneumoniae*, lo cual estaba relacionado con el incremento de infecciones comunitarias por aislados de *E. coli* productores de BLEE del grupo CTX-M (133). Esta situación también la describieron Pitout y cols. al estudiar de manera prospectiva una serie de aislados de *E. coli* productores de BLEE durante 3 años y detectar que el 70% eran de origen comunitario y el 30% nosocomial. De todos los aislados, el 71% era productor de CTX-M (134).

En España también se detectó este cambio epidemiológico. En el año 2001 se detectaron los primeros casos comunitarios causados por *E. coli* productor de CTX-M (135) pero después se produjo una diseminación comunitaria de cepas productoras de BLEE en todo el ámbito nacional. Según los resultados del proyecto del GEIH-2000, el 50% de los aislados de *E. coli* BLEE fueron comunitarios y el 66% eran muestras de origen urinario. En un trabajo posterior, se identificaron las BLEE del proyecto anterior y encontraron que las enzimas más prevalentes fueron CTX-M-9 (27,3%), SHV-12 (23,8%), CTX-M-14 (20,5%) y TEM (19%), pero ningún aislado fue productor de CTX-M-15 (136). Seis años más tarde, en el estudio del GEIH-BLEE 2006, el porcentaje de casos comunitarios aumentó hasta un 67,2% y las BLEE más prevalentes fueron CTX-M (72%), dentro del cual CTX-M-14 era tres veces más frecuente que CTX-M-15; seguido de SHV (26,8%) con SHV-12 como enzima predominante y, en último lugar, el grupo TEM (1,2%) (124).

La situación en el área de Sevilla era similar a la ocurrida tanto a nivel mundial como nacional. En un estudio que se llevó a cabo en los años 2001-2002 en un hospital de la ciudad, se confirmó que la mitad de los casos de infección por *E. coli* productor de BLEE afecta a pacientes no hospitalizados (137). En cuanto al cambio epidemiológico de las BLEE, se detectó durante los años 1995-98 que los aislados de *E. coli* producían principalmente BLEE del grupo SHV, si bien a partir de 1999 producían cualquiera de los 3 tipos. Con el transcurso de los años destaca el notable aumento de aislados productores de CTX-M (aunque ninguna CTX-M-15) a costa de un descenso de SHV (108).

---

## 1.8. Dispersión de los genes *bla*. Elementos móviles

Desde el punto de vista molecular, la diseminación de las BLEE se ha producido por un doble mecanismo: a través de clones epidémicos, como se verá posteriormente y, por otro lado, a través de elementos genéticos móviles, los cuales se han diseminado entre distintos clones de una especie e incluso entre distintas especies bacterianas. Estos elementos genéticos móviles, tales como plásmidos, secuencias de inserción (IS), transposones e integrones, pueden llevar además genes de resistencia a otros antimicrobianos como quinolonas, aminoglucósidos y sulfamidas. Las estructuras genéticas que albergan los genes *bla* pueden ser muy complejas, con distintos elementos móviles o parte de ellos integrados en otros (integrón dentro de transposón y todo ello dentro de un plásmido) y, además, pueden evolucionar con el tiempo a consecuencia de nuevos procesos de movilización, inserción, delección, etc. De todos ellos, cabe destacar a los plásmidos por su papel en la diseminación no clonal de los genes *bla*.

### 1.8.1. Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico circular o lineal y autorreplicables, cuyo tamaño varía desde una a varios cientos de kilobases. El número de copias plasmídicas presentes en una célula también es variable, desde una copia hasta decenas. Contienen tanto genes esenciales para el inicio y control de la replicación como genes de resistencia antimicrobiana y virulencia (138).

La unidad genética involucrada en la replicación se denomina replicón, el cual alberga genes que codifican las proteínas implicadas en el inicio de replicación (*rep*), así como otras proteínas (*inc* y *cop*) y elementos (ARN antisentido) que lo controlan, y secuencias específicas de unión de las proteínas que colaboran en el inicio de la replicación (139). Los plásmidos pueden ser no conjugativos o conjugativos, dentro de los cuales se incluyen los plásmidos portadores de los genes *bla*. Este tipo de plásmidos permite la diseminación de este mecanismo de resistencia no sólo entre distintas cepas de la misma especie sino también entre distintas especies bacterianas (140,141).

### 1.8.1.1. Clasificación de los plásmidos

La clasificación de los plásmidos comienza a ser importante a final de los años 50, tras el descubrimiento de los plásmidos R o de resistencia y el reconocimiento de su extensión.

Se conocen varios sistemas de clasificación, de los cuales el primero, desarrollado en los años 60, atendía a las características relacionadas con la capacidad de transferencia por conjugación y a la capacidad de inhibir la transferencia del plásmido F. Pero la existencia de plásmidos inclasificables según dichos criterios, dio lugar a sistemas posteriores que clasifican los plásmidos basándose en una propiedad universal a todos ellos y de carácter estable: “la incompatibilidad”. Mediante esta se definieron “incompatibles” aquellos plásmidos con el mismo control de replicación o replicones, y “compatibles” si era diferente.

En 1971, Hedges y Datta propusieron un sistema de clasificación mediante la introducción de un plásmido en una célula portadora de otro plásmido cuyo grupo de incompatibilidad era conocido (plásmido residente). Si en la célula hija no persistía el plásmido, ambos eran clasificados en el mismo grupo de incompatibilidad. En el caso de que ambos coexistieran, eran clasificados en distintos grupos de incompatibilidad (142). Pero la incapacidad de ciertos plásmidos para transferirse, o el hecho de que alguno no tuviera marcadores seleccionables, fueron algunas de las complicaciones de este sistema. Además, la existencia de plásmidos multirreplicón dio lugar a la aparición de grupos de incompatibilidad que realmente no existían. Ya que si al introducir un plásmido con un replicón había coincidencia con alguno de los que contenía el multirreplicón residente, no era eliminado.

Para evitar estos inconvenientes, se desarrollaron técnicas moleculares que partían del mismo concepto. En 1988 Couturier desarrolló un esquema de clasificación basado en el reconocimiento de los diferentes replicones mediante hibridación por *Southern blot* (139). Utilizó una colección de diecinueve sondas específicas que contenían al menos uno de los determinantes de incompatibilidad asociados a las funciones de replicación o partición (mantenimiento). Dichas sondas derivaban de diecisiete grupos de incompatibilidad: tres de ellas (repFIA, repFIB, repFIC) procedían de tres replicones de plásmidos IncFI y las dieciséis sondas restantes contenían los replicones FIIA, com9, I1, B/O, k, HI2, L/M, N, P,

---

Q, U, W, X e Y. Debido a la falta de especificidad por las reacciones cruzadas entre replicones altamente relacionados Carattoli y desarrollaron en 2005 un sistema, que es el que se utiliza en la actualidad, basado en la amplificación de los replicones mediante PCR de los 18 principales grupos mayoritarios de plásmidos en enterobacterias (HI2, HI1, I1-Iy, X, L/M, N, FIA, FIB, FIC, W, Y, P, A/C, T, K, B/O, F y FIIAs (10). Cabe mencionar que recientemente se ha separado el grupo de incompatibilidad L/M, el cual fue erróneamente clasificado según el método anteriormente descrito (143).

Los plásmidos IncF merecen una especial mención ya que están relacionados con *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *E. coli*, como veremos más adelante. Están asociados a factores de virulencia y de resistencia en enterobacterias, lo que contribuye al *fitness* de la bacteria hospedadora (144). También codifican sistemas de adicción que contribuyen a la promoción del plásmido y a la adaptación al hospedador (145). Además, estos plásmidos tienen la peculiaridad de poseer una estructura mosaico y de poder tener más de un replicón (estado del multirreplicón), por lo que no todos los plásmidos tienen el mismo esqueleto; hay partes del mismo que se han podido adquirir o perder como consecuencia de la fusión de los replicones. De ahí que, en 2010, Villa y cols. elaboraran un esquema para subtiparlos basado en la amplificación y secuenciación de las regiones implicadas en la regulación de los replicones. En el caso del replicón FII es el gen *copA* y en el caso de FIA y FIB, *repE* y *repB*, respectivamente. Existen diferentes alelos para cada una de las regiones: 31 (F1-F30) para FII, 3 (A1-A3) para FIA y 20 (B1-B19 y B23) para FIB. Según el alelo de cada replicón, se puede identificar el plásmido siguiendo la fórmula FAB (FII:FIA:FIB) (146).

Respecto a la diseminación de las BLEE es destacable la asociación entre una BLEE determinada con plásmidos pertenecientes a un grupo concreto de incompatibilidad. En Madrid se han descrito aislados productores de CTX-M-9, cuyos genes *bla* se han vinculado principalmente con plásmidos de amplio rango, IncHI2, aunque también a otros de estrecho rango, como los del grupo IncP1 (147). En el caso de los genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> parecen estar ligados a plásmidos IncFII, como se ha descrito en Canadá, Francia y Norte de África (148). Aunque también se ha relacionado con plásmidos IncFI (149) y con multirreplicones FIA-FIB, FIA-FIB-FII y FIB-FII (150). En el caso de SHV-12, se ha encontrado en el área de Sevilla que los genes *bla* estaban mayoritariamente vehiculizados por plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad IncI1 (151).

## 1.9. Clon ST131. Descubrimiento y características generales.

Hasta el año 2008 el aumento en la diseminación de las BLEE había tenido lugar por parte de diferentes aislados de *E. coli* epidemiológicamente no relacionados. En este contexto epidemiológico, se describe la emergencia intercontinental de un clon productor de CTX-M-15, denominado O25:H4-ST131. Este hecho tuvo lugar tras comprobar que de 41 aislados procedentes de ocho países pertenecientes a tres continentes, 36 se aislaron en 7 países de ellos y presentaban características similares en cuanto a grupo filogenético, pulsotipo, resistencia antimicrobiana y virulencia. Aunque presentaban perfiles de restricción similares, los aislados de este grupo clonal se agruparon en varios *clusters* relacionados (152).

Esta presencia de aislados clonales a nivel mundial también la describen en otro trabajo Coque y cols., quienes analizaron 43 aislados productores de CTX-M-15 procedentes de 7 países (entre ellos España) y correspondientes al período 2000-2006. También se incluyeron 6 plásmidos portadores de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> procedentes de la India. Se detectaron cepas del grupo clonal ST131 en todos los países, encontrándose en la mayoría de las cepas (37 de 43) el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> vehiculado por plásmidos del grupo de incompatibilidad IncFII. Además, la mayoría de estos plásmidos portaban otros determinantes de resistencia como *bla*<sub>OXA-1</sub>, *aac(6')-Ib-cr*, y *bla*<sub>TEM-1</sub>. Al analizar los perfiles de restricción plasmídica, se encontraron 3 plásmidos mayoritarios, de los cuales uno estaba presente únicamente en los aislados de ST131 expandidos a nivel mundial (67).

### 1.9.1. Características del clon ST131

Como ya se ha comentado en el trabajo de Chanoine, los aislados de *E. coli* pertenecientes al clon ST131, inicialmente detectados, presentaban las mismas características. Todos tenían la variante b de O25, pertenecían al serotipo O25b:H4, filogrupos B2 y secuenciotipo ST131. Además, compartían la característica de ser multiresistentes tanto a betalactámicos por producción de BLEE (CTX-M-15), como a otros antimicrobianos; y de poseer determinados genes de virulencia que los incluía como ExPEC, entre los que destacan: *iha* y *fimH* (codifica receptor adhesina-sideróforo y fimbria tipo I, respectivamente), *sat* (codifica toxina), *kpsM* (codifica proteína implicada en síntesis polisacárido capsular), *fyuA* e *iutA* (codifica sideróforos), *usp* (codifica proteína específica

uropatogénica), *traT* (codifica proteína de resistencia al suero), *ompT* (codifica proteasa de membrana externa), y *malX* (codifica marcador de isla de patogenia) en un elevado número de cepas. En menor proporción se encontraban tres genes: *hlyF* (codifica hemolisina), *iss* (codifica proteína para sobrevivir en suero) e *iroN* (codifica sideróforo) (152,153).

Es de destacar que los genes implicados en la multirresistencia están vehiculizados mayoritariamente en plásmidos IncF y que al contrario de lo que sucede con otras cepas patógenas, en las que ya se comentó anteriormente que había una relación inversa entre resistencia y virulencia, los aislados de *E. coli* ST131 resistentes a quinolonas y a cefalosporinas de espectro extendido presentan genes de virulencia con más frecuencia que la población sensible (152).

### 1.9.2. Tipado de ST131

A pesar de que estamos hablando de un clon, existe cierta diversidad de linajes o subgrupos dentro de este grupo de microorganismos. Respecto al MLST, el tipo de secuencia ST131 fue originalmente identificado usando el esquema de Achtman (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>), el cual es utilizado por muchos investigadores para identificarlo de manera rutinaria. Según este esquema, los aislados de *E. coli* ST131 presentan secuencias uniformes de los genes conservados (tabla 5). También se puede utilizar el esquema de Pasteur (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/EColi.html>) (Tabla 6), el cual identifica diferentes ST a las obtenidas mediante el esquema de Achtman. Además, se ha encontrado mayor diversidad dentro del linaje de ST131 siguiendo el esquema francés que el de Achtman.

Gen	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>
Alelo	53	40	47	13	36	28	29

Tabla 5. Combinación alélica de ST131 según el esquema de Achtman (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>).

Gen	<i>dinB</i>	<i>icdA</i>	<i>pabB</i>	<i>polB</i>	<i>putB</i>	<i>trpA</i>	<i>trpB</i>	<i>uidA</i>
Alelo	2	65	3	10	26	7	4	57

Tabla 6. Combinación alélica de ST131 según el esquema de Pasteur (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/EColi.html>).

Respecto al tipado mediante PFGE es de destacar que existen diferentes linajes dentro del clon ST131, lo cual ponen de manifiesto Nicolas-Chanoine y cols. con la primera descripción de este clon, cuando detectaron aislados con pulsotipos similares en zonas muy distantes y pulsotipos muy divergentes en áreas geográficas relacionadas (152). Esta distinción también la describen Johnson y cols. al estudiar una colección de aislados de *E. coli* ST131 recogidos durante el período 1967-2009 y procedentes de diferentes países. En esta vasta colección se identificaron linajes en todos los países, mientras que otros se circunscribían a una determinada zona (154).

### **1.9.3. Método de subtipado. Secuenciación de *fimH***

En el caso de ST131, todos los aislados presentan el gen *fimH*, el cual codifica la fimbria tipo 1 que determina la unión de la manosa de la bacteria con la célula diana (155). Existen dos esquemas de tipado: uno basado en el análisis de los 424 pares de bases (pb) de la secuencia de *fim* (156) y otro en el de región de tipado (*fim-H<sub>TR</sub>*) de 489 pb (157). En base a la secuencia del gen *fimH* se diferencian varios subclones o linajes, 46 en el caso del primer esquema y 58 según el segundo. El esquema que ha tenido mayor éxito y al que hacen referencia en multitud de estudios es el de Weissman. Basándose en este, Johnson y cols. analizaron la colección de referencia de aislados ST131 (1967-2011) y obtuvieron 7 subclones con distintos perfiles de resistencia a antibióticos: H15, H22, H27, H30, H35, H41, H94, siendo los más prevalentes *fimH30*, *fimH22* y *fimH41*. Durante el primer período (1967-1999) encontraron aislados sensibles a FQ, entre los que predominaban los subclones H22 y H35. Los aislados resistentes a FQ se detectaron en el período 2000-2005 y se asociaron casi exclusivamente con el subclon H30 (70% de los aislados). La mayoría de los aislados del subclon H41 fueron sensibles a ciprofloxacino y se aislaron entre los años 2006-2011 (158).

### **1.9.4. Aislados de *E. coli* ST131 productores de CTX-M-15**

La emergencia y la propagación a nivel mundial de CTX-M-15 ha cambiado la epidemiología de *E. coli* productor de BLEE y las enzimas prevalentes. Como hemos visto anteriormente, la diseminación del clon ST131 productor de CTX-M-15 es universal, aunque no es homogénea y llegan a observarse grandes diferencias entre áreas y países. Una de las regiones mejor estudiadas es Norteamérica, como se pone de manifiesto en los siguientes estudios. En Canadá, según un estudio de bacteriemias por *E. coli*, durante los

---

años 2000-2007, se produjo un aumento de los aislados que producían BLEE desde un 0,3% en el primer año hasta el 5% al final del período. CTX-M-15 se detectó por primera vez en el año 2002, pero sufrió un acusado aumento a partir del año 2005. Paralelamente a este incremento se producía un aumento de los aislados de *E. coli* ST131, de modo que el 24% de los aislados que se detectaron en el año 2005 ascendió hasta un 57% en el año 2007 (159). Cuando se describió este clon en EE.UU., la frecuencia de aislamiento era muy baja, pero recientemente se ha observado un incremento muy importante, hasta el punto de que este grupo ha sido descrito como el predominante en algunas áreas. En Pensilvania el 81% de los aislados de *E. coli* productores de BLEE analizados entre 2007 y 2008 producía BLEE del grupo CTX-M. Dentro de este grupo todos los aislados productores de CTX-M-15 (80%) pertenecían al clon ST131 (160).

De forma similar a lo que estaba ocurriendo en los demás países, este clon se detectó como el responsable parcial del aumento de aislados productores de CTX-M-15 en el nuestro. En un estudio en el que se determinó la prevalencia y el tipo de BLEE producido por los aislados de *E. coli* durante los años 2006-2008, se obtuvo un aumento en la prevalencia de *E. coli* BLEE del 3,8% en el año 2006 a un 7,4% en el 2008. Las enzimas más frecuentemente encontradas fueron: CTX-M-14 (57,1%), CTX-M-15 (21,9%), SHV-12 (9,5%) y CTX-M-32 (6,7%). Todos los aislados productores de CTX-M-15 se englobaban en el clon ST131 (Blanco et al, 2009). En un estudio multicéntrico nacional realizado en 2004 las enzimas prevalentes fueron CTX-M-14 (45,7%), CTX-M-9 (20,6%) y SHV-12 (21,7%). Al igual que en el estudio del GEIH-BLEE-2000 de características similares, no se detectaron aislados productores de CTX-M-15 (107,161).

Como ya comentamos anteriormente, los aislados de este clon que se describieron por primera vez eran productores de CTX-M-15, lo cual se describe en multitud de estudios. Uno de ellos es un estudio multicéntrico realizado en Canadá el cual analiza una serie de 209 aislados de *E. coli* productores de BLEE y detecta que el 46% fueron miembros del clon ST131, de los cuales el 91% era productor de CTX-M-15 (162). Por otra parte, Johnson y cols. encontraron la misma tasa de aislados ST131 entre aislados productores de BLEE procedentes de 15 centros estadounidenses durante el período 2000-2009, si bien la prevalencia de los que producían CTX-M-15 era algo menor (70%) (163).

Según los primeros estudios que se llevan a cabo en Europa, este clon también resulta ser uno de los más prevalentes en la comunidad, aunque no producían CTX-M-15 con tanta frecuencia como en América. Cagnacci y cols. contaron con que el 23% de los



aislados de *E. coli* analizados durante el 2003 al 2006, procedentes de 32 centros y 8 países, eran ST131. El 8,1% de los aislados de *E. coli* producía BLEE, siendo la más común CTX-M-15 (164). En Francia, en un estudio realizado durante el 2006, se analizaron 72 aislados productores de BLEE, muchos de los cuales expresaban enzimas CTX-M; 40 (55,5%) aislados de *E. coli* eran productores de CTX-M-15, de los cuales 10 (25%) correspondían al clon ST131 (165).

También cabe mencionar que existen zonas donde se han diseminado otras enzimas del grupo CTX-M con mayor frecuencia que CTX-M-15. En el caso de Reino Unido CTX-M-15 es la enzima prevalente, aunque también se ha detectado CTX-M-3. Durante los años 2003-04 se analizaron mediante PFGE 291 aislados de *E. coli* productores de BLEE procedentes de 42 centros del Reino Unido, distinguiéndose 5 cluster definidos como cepas A, B, C, D, E, los cuales englobaban desde 13 aislados (cepa B) hasta 110 aislados (cepa A) (166). Posteriormente se estudiaron los plásmidos de 3 aislados representativos de las cepas A, B y C, encontrándose que los plásmidos de la cepas A y B vehiculizaban *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y el de la cepa C *bla*<sub>CTX-M-3</sub> (145).

Sin embargo, en otras zonas como Japón, es la menos frecuente o no llega a detectarse. En un trabajo donde se estudiaron 142 aislados de *E. coli* productores de BLEE procedentes de 200 hospitales durante el período 2002-2003, se halló que el 22% de los aislados pertenecía al clon ST131, de los cuales ninguno producía CTX-M-15. La enzima más frecuente fue CTX-M-14 (74%), seguida de CTX-M-35 (15%) y CTX-M-2 (11%) (167). En otro estudio realizado durante el período 2001-2012 con 1079 aislados de *E. coli* productores de BLEE procedentes de 10 hospitales se obtiene que el 43% correspondía a ST131. De estos, casi la mitad (49,6%) de los aislados producía CTX-M-27, un 33% producía CTX-M-14 y un 17% CTX-M-15 (168).

Por otro lado, también hay que mencionar que se han detectado aislados que no producen BLEE, como queda constancia en un trabajo canadiense y otro español, en los que sólo el 6% y 7%, respectivamente, de los aislados clonales producían BLEE (153,169). Y también es de señalar que recientemente se han descrito varios casos de aislados de este clon productores de carbapenemasas relacionados tanto con ingreso hospitalario como con la atención comunitaria. En EEUU se detectó un aislado de ST131 productor de NDM en una muestra de un paciente con infección urinaria que había estado ingresado con anterioridad en un hospital de la India (170) y en Francia en una muestra de una paciente que había estado viviendo en la India, pero que nunca había sido hospitalizada

---

previamente (171). También se han detectado aislados de *E. coli* ST131 productores de IMP-14 en Tailandia, enzima que está relacionada con *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. (172), de KPC en Irlanda (173) e Italia (174), y de OXA-48 en EEUU (175) y España (176).

### **1.9.5. Aislados de *E. coli* ST131 resistentes a FQ**

Otra de las características ya mencionadas de los aislados ST131 es la asociación con la resistencia a FQ. Cuando observamos un aumento significativo de un fenotipo de resistencia, se debe en general a dos fenómenos: a la movilización horizontal de un determinante de resistencia en un área y momento determinado o a la diseminación clonal. El aumento en la prevalencia de dicha resistencia puede deberse a que tiene un genoma móvil y a la capacidad de intercambiar material genético, pero también puede ser debido a la diseminación clonal. Respecto a esta última, se ha llegado a la conclusión de que el aumento de la resistencia a FQ de forma simultánea en Norteamérica y Europa y Asia fue debido a la emergencia de un número reducido de clones, entre ellos ST131 y O15:K52:H1. En Canadá, durante los años 2002-2004, 64% de los aislados FQR pertenecían a dichos clones; el 44% correspondía a aislados del clon ST131 y el 19% al O15:K52:H1 (153). En Europa constituían globalmente el 35% del total de aislados resistentes a FQ durante los años 2003-2006 (164); en Italia y Bélgica el 61% de los aislados de *E. coli* resistentes a FQ, además de productores de BLEE, durante el año 2006 era ST131 (177,178). En Asia estas cifras varían; en Japón suponían el 33-66% de los aislados FQR, según las regiones (179), mientras que en Corea eran algo inferior, el 25% de los aislados de *E. coli* resistentes a FQ eran ST131 (180). En España en el año 2009 los clones ST131 y O15:K52:H1 contaban con el 9% y 26%, respectivamente (169).

El subtipado de los aislados de *E. coli* ST131 mediante secuenciación de *fimH* ha llevado a la identificación de múltiples subclones con distintos perfiles de resistencia a antibióticos. Es de destacar que aquellos aislados con el alelo 30 de *fimH* constituyen el sublinaje H30, el cual es el prevalente en la mayoría de las zonas estudiadas. Dentro de este subclon, gran parte de los aislados son resistentes a FQ, los cuales constituyen el sublinaje H30-R y, dentro de este, se concentra la mayoría de aquellos productores de CTX-M-15, formando otro linaje denominado H30-Rx (181–184).

### 1.9.6. Plásmidos detectados en aislados de *E. coli* ST131

Una de las características comentadas con anterioridad es la relación estrecha entre los aislados ST131 y la vehiculización de CTX-M-15 mediante plásmidos IncF. La mayoría de los plásmidos de aislados de *E. coli* ST131 que se han caracterizado son portadores de genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y se han clasificado dentro del grupo IncF (67,145,185–188). Dentro de este grupo de plásmidos, los replicones asociados con más frecuencia a *bla*<sub>CTX-M-15</sub> fueron FII y FII-FIA. Sin embargo, también hay aislados de *E. coli* ST131 portadores de plásmidos IncF que codifican otras BLEE, tales como CTX-M-14 (189), CTX-M-14 y SHV-2 (190), CTX-M-15 y SHV-12 (187) y aislados que producen CTX-M-15 codificada por genes vehiculizados por otros plásmidos diferentes de IncF, como IncI1 (186), Inc N e Inc A/C (187) o plásmidos *pir-type* (191). También se han descrito aislados que producen CMY, cuyos genes van vehiculizados en plásmidos IncI1 (192), CTX-M-65 en IncN (189) y NDM-1 en IncF (FII) (171) y en IncF (FIA) (170).

### 1.9.7. Epidemiología de ST131

Como hemos visto, ST131 ha emergido en los últimos años a nivel mundial y constituye uno de los principales patógenos tanto a nivel comunitario como nosocomial. Por este motivo y, desde el punto de vista de control sanitario, conocer la forma de diseminación es muy importante. A continuación, vamos a ver los reservorios más importantes que se ha identificado.

#### 1.9.7.1. Portadores sanos

El principal reservorio de los aislados *E. coli* extraintestinales es el tracto digestivo humano. Son varios los estudios que se han publicado acerca del papel que pueden desempeñar los portadores fecales de *E. coli* ST131 en cuanto a su diseminación. En Francia se detectó un 7% de voluntarios sanos portadores de ST131 no productor de BLEE, siendo más de la mitad resistentes a FQ. Estos aislados estaban relacionados con un subgrupo de aislados ST131 productores de CTX-M-15 de Francia, Canadá y España, lo cual puede ser indicativo de que tanto la divergencia a partir de un ancestro común, como la adquisición de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> mediante plásmidos, se ha producido recientemente (193).

---

Los aislados pertenecientes a este clon están diseminándose tanto en el ámbito hospitalario como comunitario; dentro de este último se engloban las residencias, en las cuales las tasas de infecciones por *E. coli* ST131 son muy elevadas. En Lugo, Blanco y cols. detectan que la mitad de los aislados ST131 productores de CTX-M-15 durante los años 2007-2008 procedían de residencias (194). Coincidiendo con este hallazgo, un trabajo realizado en el Norte de Irlanda, en el que se incluyeron veinte residencias, detectó que el 50% de los residentes portadores de *E. coli* productor de BLEE y resistentes a FQ pertenecían al clon ST131 (195).

### 1.9.7.2. Alimentos

La emergencia de este grupo de aislados de *E. coli* ST131 se ha limitado casi exclusivamente a la población humana, pero recientemente se ha publicado la presencia de este clon tanto en animales destinados a consumo humano, principalmente en carne de pollo y pavo, como en animales de compañía. Lo que no está claro si estos aislados proceden de transmisión animal-humano o viceversa.

En Canadá se publica por primera vez la detección de un aislado de *E. coli* ST131 no productor de BLEE en una muestra de carne de pollo crudo con un perfil genético indistinguible de uno procedente de una muestra clínica (196). En España, Mora y cols. hallan relación genética entre los aislados ST131 de muestras de origen humano y aviar, siendo estas últimas procedentes tanto del ámbito clínico veterinario como de la venta cárnica al por menor. Estos aislados eran productores de CTX-M-9 y presentaban el mismo perfil de virulencia (197).

A pesar de estos hallazgos, existen evidencias en contra de que la cadena alimentaria pueda jugar un papel en la emergencia actual de infecciones por ST131. En varios trabajos llevados a cabo en el hospital Virgen Macarena durante los años 2007-2010 no se encuentran aislados de *E. coli* ST131 en muestras procedentes de carne de ave (pollo y pavo) tanto cocinadas como destinadas a la venta al por menor (198,199). Al igual sucede con el trabajo de Johnson y cols. en el que se incluyeron aislados de *E. coli* ST131 correspondientes al período 1967-2009, ya que se encontró una asociación negativa entre los pulsotipos de aislados de humanos y los de comida de origen animal (154).

### 1.9.7.3. Detección en animales de compañía

Otra posibilidad que se ha barajado es el papel de las mascotas en la transmisión del clon ST131. El primer trabajo que informó de la presencia de un aislado del clon ST131 portador de un plásmido IncFII, hasta el momento relacionado con infecciones en humanos, correspondía al caso de un perro con bacteriuria. Dicho plásmido contenía genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *OXA-1*, *TEM-1*, *aac (6')-Ib-cr* y *qnrB2*. Además de presentar determinantes de resistencia relacionados con la clínica humana, compartía características de virulencia con un aislado previo francés de origen humano (200).

Por otro lado, se ha puesto de manifiesto la transmisión de este clon entre animales convivientes. En EE.UU. se hallaron coincidencias en cuanto a perfil de resistencia, virulencia y pulsotipo entre aislados de muestras fecales y clínicos procedentes de animales convivientes (201). Además, tras comparar los pulsotipos animales con la colección de pulsotipos humanos de Johnson J.R., se encontró coincidencia con el pulsotipo internacional 968. Por otro lado, en Australia también se encontró un alto grado de concordancia entre aislados de animales de compañía y aislados humanos en base a pulsotipo, virulencia, mutaciones cromosómicas asociadas a resistencia a FQ y perfil de sensibilidad (202). Tras analizar los pulsotipos y compararlos con los de referencia de Johnson, se encontraron que varios de ellos coincidían con algunos de alta prevalencia, entre los que destacaban el pulsotipo 968, 800 y 812.

A nivel europeo, después de analizar mediante PFGE varios aislados productores de CTX-M-15 procedentes de animales de compañía, se obtuvo más del 85% de similitud genética, pero no se compararon con aislados humanos (203).

---

.

---

## 2. Hipótesis y objetivos





## 2.1. Justificación del estudio e hipótesis de trabajo

Los cambios epidemiológicos producidos en la última década respecto a *E. coli* ha conducido a la aparición de infecciones de origen comunitario causadas por aislados de multirresistente. Junto a estos cambios tiene lugar la emergencia de un clon detectado simultáneamente en diferentes zonas geográficas del mundo, que se caracteriza por pertenecer al serogrupo O25b, filogrupo B2, secuenciotipo ST131 y ser resistente a betalactámicos por producción de CTX-M-15 y a otros antimicrobianos, entre los que destaca el ciprofloxacino. Este clon presenta otras características microbiológicas diferentes a los clones de *E. coli* mayoritarios hasta el momento y un mecanismo de diseminación que se desconoce.

Para poder diseñar medidas eficaces de control de esta expansión es necesario conocer la prevalencia del clon que existe en nuestra área, así como poder identificar sus vías de transmisión.

Las hipótesis de este estudio son las siguientes:

1. El clon O25b:H4-ST131 de *E. coli* es prevalente en nuestra área.
2. La prevalencia de *E. coli* ST131 no se debe a la adquisición de BLEE.
3. La adquisición de plásmidos con genes codificantes de BLEE es específica de un subgrupo o linaje del clon.
4. La prevalencia del clon de *E. coli* ST131 en nuestro medio se debe a la introducción muy reciente de linajes de diseminación internacional.
5. Las mascotas pueden jugar un papel en la transmisión a humanos.
6. El clon ST131 está relacionado con la años recientes.

---

## 2.2. Objetivos de este estudio

El objetivo general de este estudio se centra en determinar la prevalencia del clon ST131 y estudiar los posibles mecanismos implicados en su exitosa expansión. Para ello, se llevaron a cabo las siguientes líneas de trabajo:

1. Estudiar de forma prospectiva la frecuencia de las infecciones causadas por el clon de *E. coli* O25b:H4-ST131 en nuestra área sanitaria.
2. Comparar la distribución de los aislados de *E. coli* ST131 productores de BLEE y no productores de BLEE en nuestra área, así como los perfiles de resistencia.
3. Caracterizar los plásmidos de aislados de *E. coli* ST131 tanto productores como no productores de BLEE, en cuanto a grupo de incompatibilidad, subtipado de plásmidos IncF, co-determinantes de resistencia, factores de virulencia y sistemas de adicción.
4. Determinar la posible relación clonal entre aislados de origen humano y animal de compañía procedentes de dos zonas geográficas, Lisboa y Sevilla.
5. Conocer cuál era la prevalencia de ST131 en años anteriores y determinar cómo ha evolucionado en nuestra área sanitaria.

# 3. Material y métodos

---

## 3.1. Material

### 3.1.1. Aislados clínicos y cepas bacterianas

#### 3.1.1.1. Aislados clínicos

##### 3.1.1.1.1. Colección de prevalencia

Se recogieron todos los aislados consecutivos de *E. coli* procedentes de muestras remitidas a los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío (HUVR) y Virgen Macarena (HUVM) durante el año 2010. Las muestras procedían de centros de atención primaria, consultas de especialidades y de ambos centros hospitalarios, lo cual supone la atención de aproximadamente 1.000.000 de habitantes. Todos los aislados recuperados de las muestras del HUVR se enviaron semanalmente al HUVM para su posterior análisis.

Se rechazaron aquellos aislados sucesivos procedentes del mismo paciente, si el tiempo transcurrido entre ellos era inferior a dos semanas.

Se categorizaron como “comunitarias” las muestras procedentes de atención primaria, consultas de especialidades y las de pacientes con ingreso hospitalario inferior a 48h, y como “nosocomiales” las que procedían de pacientes ingresados durante más de 48h.

##### 3.1.1.1.2. Colección histórica

Se incluyeron en el estudio los aislados del mes de Enero que habían sido previamente analizados durante los años comprendidos entre 2002 y 2009, ambos

---

incluidos. Dichos aislados corresponden a 3 colecciones independientes pertenecientes al HUVM:

#### Colección de Enero

Los aislados de esta colección proceden de muestras de cualquier origen, excepto hemocultivos. Se han incluido 206 aislados.

#### Colección Bacteriemias

Se han incluido en el estudio 91 aislados.

#### Colección BLEE

Los aislados productores de BLEE proceden de cualquier tipo de muestra clínica, salvo hemocultivos. Se han incluido 144 aislados.

#### **3.1.1.1.3. Colección de Lisboa**

Fueron objeto de estudio 59 aislados de Lisboa, los cuales fueron cedidos por la Dra. Pomba. Estos aislados procedían de dos orígenes:

- Animal: 31 aislados procedían de animales (perros y gatos) con ITU comunitaria. Las muestras se recogieron en el Hospital de Veterinaria de Lisboa entre los años 2004 y 2009.
- Humano: 28 aislados procedían de muestras clínicas de personas que se recibieron en el hospital o en el laboratorio de diagnóstico comunitario, los cuales cubren un área de 365.000 habitantes. Las muestras se recogieron durante los años 2005-2006.

#### **3.1.1.2. Colección de referencia de Johnson**

La colección de referencia consta de 579 aislados de *E. coli* ST131 procedentes de EEUU (N=446), Canadá (N=53) y otros 11 países internacionales (N=80), recogidos durante el período 1967-2009. Las fuentes son de origen humano, animales de compañía, animales destinados a comida y agua, entre otras.

Los aislados proceden de colecciones de investigadores o de centros de referencia seleccionados según fenotipo de resistencia, antígeno somático, origen geográfico y/o síndrome clínico de interés.

Los 579 aislados se corresponden con 170 pulsotipos, de los cuales 105 son únicos y 65 múltiples, es decir, un pulsotipo corresponde a un aislado o a más de uno, respectivamente. Los pulsotipos múltiples suponen el 82% de los aislados, siendo la mitad de esta población representada por 12 pulsotipos con 6 o más aislados cada uno. Éstos reciben el nombre de pulsotipos de alta prevalencia, entre los cuales, los que presentan mayor número de aislados son el 968, con el 24% de la población, el 800 y el 812.

Cabe destacar que existe una asociación entre los pulsotipos y el patrón de sensibilidad, siendo la producción de BLEE específica de los pulsotipos de alta prevalencia, excepto el 968. En el caso de la resistencia a quinolonas, hay relación con todos los pulsotipos múltiples. Respecto al año del aislamiento es importante mencionar que hay una distribución temporal, asociándose los pulsotipos de alta prevalencia con aislados de años más recientes.

El Dr. Johnson nos cedió 13 aislados de esta colección para realizar el estudio de la relación genética de los aislados.

### 3.1.1.3. Cepas control

Las características de las cepas bacterianas más destacables utilizadas en este trabajo se describen a continuación:

#### *Escherichia coli*

- Cepa control en la detección del serogrupo O25b, alelo *pabB3* y grupo filogenético: *E. coli* 307. Cedida por la Dra. Egea.
- Cepas control en la producción de BLEE:

*E. coli* productor de BLEE del grupo CTX-M-1, cedida por la Dra. Egea.

*E. coli* productor de BLEE del grupo CTX-M-9, cedida por el Dr. Hernández.

*E. coli* productor de BLEE del grupo CTX-M-15, cedida por el Dr. Hernández.

---

## Salmonella

- Cepa control para la normalización de los pulsotipos, cedida por el Dr. Jorge Blanco del LREC (Lugo): *S. braenderup* H9812.

### 3.1.1.4. Cepa receptora en experimentos de transformación

- *E. coli* DH10B (F-*mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *endA1* *ara* $\Delta$ 139(*ara*, *leu*)7697 *galUgaK $\lambda$ -rpsL* (Str<sup>R</sup>) *nupG*) (Grant, 1990. Genetics).

### 3.1.2. Medios de cultivo

- Agar McConkey (McC, Oxoid): medio sólido utilizado para seleccionar los aislados de *E. coli*.
- Agar McConkey con cefotaxima (2 mg/l): medio sólido utilizado para seleccionar los aislados de *E. coli* productores de BLEE.
- Agar Mueller-Hinton (MHA, Difco): medio sólido para el estudio de la sensibilidad de los aislados de *E. coli*.
- Agar Mueller-Hinton con ampicilina (100 mg/l).
- Caldo Luria Bertani (Caldo LB, Difco): medio rico en nutrientes.
- Caldo de triptona y soja (TSB, Difco) enriquecido con un 10% de glicerol (Panreac): medio líquido para la congelación de los microorganismos.
- Medio SOC (Difco): medio sólido utilizado en el protocolo de transformación. Añadir 10ml de KCl 250 mM y enrasar hasta 1L. Tras autoclavar y, una vez frío, añadir 20 ml de glucosa 1M y 5 ml de MgCl<sub>2</sub> 2M.

### 3.1.3. Antibióticos

#### 3.1.3.1. Suplementos de medios de cultivo

- Ampicilina (AMP, Sigma-Aldrich).
- Cefotaxima (CTX, Sigma-Aldrich).



- Ceftazidima (CAZ, Sigma-Aldrich).

La preparación de los antimicrobianos se realizó siguiendo las normas del CLSI. Las soluciones se prepararon a una concentración de 4096 µg/ml y se conservaron a -70°C hasta su utilización. Los solventes y diluyentes que se usaron en la preparación se muestran en la siguiente tabla:

Antimicrobiano	Solvente	Diluyente
Ampicilina	Tampón fosfato, pH 8, 0.1M.	Tampón fosfato, pH 6, 0.1M
Cefotaxima	Agua	Agua
Ceftazidima	Carbonato sódico	Agua

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

### 3.1.3.2. Discos para estudios de sensibilidad

#### Betalactámicos

- Ampicilina (Amp, 25 µg, Oxoid).
- Amoxicilina/clavulánico (AMC, 30 µg, Oxoid).
- Piperacilina/tazobactam (PT, 36 µg, Oxoid).
- Cefuroxima (CFX, 30 µg, Oxoid).
- Cefotaxima (CTX, 30 µg, Oxoid).
- Ceftazidima (CAZ, 30 µg, Oxoid).
- Cefotaxima/clavulánico (CTX/CLA, 30/10 µg, Oxoid).
- Ceftazidima/clavulánico (CAZ/CLA, 30/10 µg, Oxoid).

#### Aminoglucósidos

- Gentamicina (GN, 10 µg, Oxoid).
- Tobramicina (TOB, 10µg, Oxoid).
- Amikacina (AK, 30µg, Oxoid).

---

## Quinolonas

- Ácido Nalidíxico (NA, 30 µg, Oxoid).
- Ciprofloxacino (CIP, 5 µg, Oxoid).

## Otros

- Trimetropim-Sulfametoxazol (TMX, 25µg, Oxoid).
- Fosfomicina (FOT, 200 µg, Oxoid).

### 3.1.4. Soluciones y reactivos

#### 3.1.4.1. Soluciones y tampones de uso general

- Tampón de carga

Sacarosa	4 g
Azul de bromofenol	0,025 g
Agua ultrapura grado Milli-Q c.s.p	10 ml

- Solución salina

NaCl	4,25g
Agua ultrapura grado Milli-Q	500 ml

- EDTA Na<sub>2</sub> 0,5 M pH 8

EDTA Na <sub>2</sub>	94 g
Agua ultrapura grado Milli-Q c.s.p.	500 ml

Disolver añadiendo NaOH, ajustar el pH con CH<sub>3</sub>COOH y enrasar a 500 ml.

- Solución de glicerol al 10%

• Glicerol	20 ml
• Agua ultrapura grado Milli-Q	180 ml

- Solución de KCl

KCL	1,86 g
-----	--------

Agua ultrapura grado Milli-Q	100 ml
------------------------------	--------

- Tris-Borato-EDTA (TBE) 10X

Trizma base	108 g
-------------	-------

Ácido bórico	55 g
--------------	------

EDTA 0,5M pH 8	40 ml
----------------	-------

Agua ultrapura grado Milli-Q c.s.p.	1000 ml
-------------------------------------	---------

- Tris-Acético-EDTA (TAE) 50X

Trizma-base	242 g
-------------	-------

Ácido acético	57.1 ml
---------------	---------

EDTA Na <sub>2</sub> dihidratado	37,2 g
----------------------------------	--------

Agua ultrapura grado Milli-Q c.s.p.	1000 ml
-------------------------------------	---------

- PBS pH 7,2

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,144 g
---------------------------------	---------

NaHPO <sub>4</sub> heptahidratado	1,775 g
-----------------------------------	---------

NaCl	8,5 g
------	-------

Agua ultrapura grado Milli-Q c.s.p.	1000 ml
-------------------------------------	---------

- Tris-HCl 1M pH 8

Trizma-base	121,1 g
-------------	---------

Agua ultrapura grado Milli-Q	1000 ml
------------------------------	---------

Ajustar con HCl hasta alcanzar pH 8 antes de enrasar hasta 1000 ml.

- Solución de glucosa al 20%

Glucosa	20 g
---------	------

---

Agua ultrapura grado Milli-Q	100 ml
------------------------------	--------

Esterilizar por filtración.

### 3.1.4.2. Soluciones y tampones utilizados en extracción de plásmidos. Método de Takahashi

- Buffer A (Tris acético 50mM + EDTA Na<sub>2</sub> 2mM pH 8)

Tris-acético 1M	2,5 ml
-----------------	--------

EDTA 0,5M pH 8	200 µl
----------------	--------

Agua ultrapura grado Milli-Q c.s.p.	50 ml
-------------------------------------	-------

- Solución de lisis (SDS 4% + 100mM Tris-HCl pH 8+ 0,45N NaOH)

SDS 20%	10 ml
---------	-------

Tris-HCl 1M pH 8	5 ml
------------------	------

NaOH 5 N	4,5 ml
----------	--------

Agua ultrapura grado Milli-Q c.s.p.	50 ml
-------------------------------------	-------

### 3.1.4.3. Soluciones y tampones utilizados en PFGE

- Tampón Tris-EDTA (TE)

Tris-HCl 1M pH 8	10 ml
------------------	-------

EDTA Na <sub>2</sub> 0,5M pH 8	2 ml
--------------------------------	------

Agua ultrapura grado Milli-Q	988 ml
------------------------------	--------

- Solución de Lauril Sulfato Sódico (SDS) 10%

SDS	21,27 g
-----	---------

Agua ultrapura grado Milli-Q	200 ml
------------------------------	--------

- Solución de Lauril Sulfato Sódico (SDS) 20%

SDS	42,54 g
-----	---------

---

Agua ultrapura grado Milli-Q	200 ml
• Solución de proteinasa K (20 mg/ml)	
Proteinasa K	20 mg
Agua ultrapura grado Milli-Q estéril	1 ml
• Tampón de suspensión	
Tris-HCl 1M pH8	10 ml
EDTA Na <sub>2</sub> 0.5M pH8	20 ml
Agua ultrapura grado Milli-Q	70 ml
• Solución de lisis (500 ml)	
Tris-HCl 1M pH 8	25 ml
EDTA Na <sub>2</sub> 0.5M pH8	50 ml
Sarcosil 10%	50 ml
Agua ultrapura grado Milli-Q	375 ml
• Tampón de restricción (200 µl por aislado)	
Buffer 10X	20 µl
Agua ultrapura grado Milli-Q	180µl
• Solución de restricción (200µl por aislado)	
Agua ultrapura grado Milli-Q	173µl
Buffer 10x	20µl
Enzima de restricción <i>Xba</i> I	5µl
BSA (albúmina bovina)	2 µl
• TBE 0,5X	
TBE 10X	100 ml
Agua ultrapura grado Milli-Q	1900 ml
Tampón maleico	200 ml

---

---

Tween 20

600 µl

### 3.1.5. Productos químicos

- Agarosa Grade Molecular Biology
- Agarosa D-1 baja EEG
- Agarosa para PFGE
- Ácido acético
- Ácido bórico
- Ácido clorhídrico
- Ácido maleico
- Azida sódica
- Azul de bromofenol
- Bromuro de etidio
- Citrato sódico
- Cloruro magnésico
- Cloruro potásico
- Cloruro sódico
- Desoxinucleótidos trifosfato
- EDTA, Ácido etilendiaminotetraacético
- EDTA Na
- Enzima *EcoRI*
- Enzima *SmaI*.
- Enzima *XbaI*
- Etanol absoluto 98%
- Fosfato dipotásico
- Fosfato potásico dihidratado
- Glucosa
- Glicerol 87%
- Hidróxido sódico
- Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder
- Proteinasa K
- Sacarosa
- Sarcosil
- SDS
- Taq DNA polimerasa
- Tampón maleico
- TBE
- Tris: Trizma Base
- Tween 20

### 3.1.6. Cebadores

Cebador	Secuencia (5´-3´)	Tm esperado (pb)	Referencia
O25-F	ATACCGACGACGCCGATCTG	300	(204)
O25-R	TGCTATTCATTATGCGCAGC		

**Tabla 8.** Cebadores utilizados para la detección del serogrupo O25b.

Cebador	Secuencia (5´-3´)	Tm esperado (pb)	Referencia
O25pabB-F	TCCAGCAGGTGCTGGATCGT	347	(35)
O25pabB-R	GCGAAATTTTTCGCCGTACTGT		

**Tabla 9.** Cebadores utilizados para la detección del alelo 3 de *pabB*.

Cebador	Secuencia (5´-3´)	Tm esperado (pb)	Referencia
chuA-1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	(46)
chuA-2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
yjaA-1	TGAAGTGCAGGAGACGCTG	211	
yjaA-2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		
tspE4.C2-1	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA	152	
tspE4.C2-2	CGCGCCAACAAAGTATTACG		

**Tabla 10.** Primer set de cebadores utilizados en el estudio de filogrupos (Invitrogen).

Cebador	Secuencia (5´-3´)	Tm esperado (pb)	Referencia
chuA-1	ATGATCATCGCGGCGTGCTG	281	(47)
chuA-2	AAACGCGCTCGCGCCTAAT		
yjaA-1	TGTTGCGGATCTTGAAAGCAAACGT	216	
yjaA-2	ACCTGTGACAAACCGCCCTCA		
tspE4.C2-1	GCGGGTGAGACAGAAACGCG	152	
tspE4.C2-2	TTGTCGTGAGTTGCGAACCCG		
gadA-1	GATGAAATGGCGTTGGCGCAAG	373	
gadA-2	GGCGGAAGTCCCAGACGATATCC		

**Tabla 11.** Segundo set de cebadores utilizados en el estudio de filogrupos (Invitrogen).

Cebador	Secuencia (5´-3´)	Tm esperado (pb)	Referencia
CTX-M-1-F	ATGGCGACGGCAACCGTCA	875	(205)
CTX-M-1-R	CAAACCGTTGGTGACGATTTTA		
CTX-M-9-F	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	856	(205)
CTX-M-9-R	ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC		
SHV-1-F	GGGTTATTCTTATTTGTC GC	930	(206)
SHV-2-R	TTAGCGTTGCCAGTGCTC		

**Tabla 12.** Cebadores específicos para cada grupo de BLEE (TIB Molbiol).

Cebador	Secuencia (5´-3´)	Tm esperado (pb)	Referencia
fimH-F	CACTCAGGGAACCATTCAGGCA	975	(157)
fimH-R	CTTATTGATAAACAAAAGTCAC		

**Tabla 13.** Cebadores utilizados para la amplificación del gen *fimH* (TIB Molbiol).



Cebador	Secuencia (5'-3')	Tm esperado (pb)	Referencia
L/M FW	GGATGAAAACACTATCAGCATCTGAAG	785	
L/M RV	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG		
N FW	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	559	
N RV	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC		
X FW	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	376	
X RV	TGAGAGTCAATTTTTTATCTCATGTTTTAGC		
I1 FW	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	139	
I1 RV	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT		
HI1 FW	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	471	
HI1 RV	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA		
HI2 FW	TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC	644	
HI2 RV	GGTCACTACCGTTGTCATCCT		(10)
T FW	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	750	
T RV	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC		
A/C FW	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	465	
A/C RV	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTCCTT		
B/O FW	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC	159	
B/O RV	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA		
P FW	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	534	
P RV	CACGCGCCAGGGCGCAGCC		
Y FW	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	765	
Y RV	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTTT		
W FW	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG	242	
W RV	GGTGCGCGGCATAGAACCGT		

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tm esperado (pb)	Referencia
K FW	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC	160	
K RV	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA		
F FW	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	270	
F RV	GAAGATCAGTCACACCATCC		

**Tabla 14.** Cebadores utilizados para la caracterización del grupo de incompatibilidad mediante *PCR-Based Replicon Typing* (PBRT) (TIB Molbiol).

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tm esperado (pb)	Referencia
FII FW	CTGATCGTTTAAGGAATTTT	258-262	
FII RV	CACACCATCCTGCACTTA		
FIA FW	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	462	
FIA RV	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG		
FIB FW	TCTGTTTATTCTTTTACTGTCCAC	683	(10)
FIB RV	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT		
*FIBs FW	TGCTTTTATTCTTAAACTATCCAC	683	
FIC FW	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	262	
FIC RV	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT		

**Tabla 15.** Cebadores utilizados para el subtipado de plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad IncF. \*Usado en pareja con FIB RV (TIB Molbiol).

Cebadores	Secuencia (5´-3´)	Tm esperado (pb)	Referencia
rep11 FW	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	142	
rep11 RV	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT		
ardA FW	ATGTCTGTTGTTGCACCTGC	501	
ardA RV	TCACCGACGGAACACATGACC		
trbA FW	CGACAAATGCTTCCGGGGT	507	(206)
trbA RV	TCTTACAATCGACAGCCTGT		
sogS FW	TTCCGGGGCGTAGACAATACT	291	
sogS RV	AACAGTGATATGCCGTCGC		
piL FW	CCATATGACCATCCAGTGCG	316	
piL RV	AACCACTATCTCGCCAGCAG		

**Tabla 16.** Cebadores utilizados para el subtipado de plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad Inc11(TIB Molbiol).

Cebador	Secuencia (5´-3´)	Tm esperado (pb)	Referencia
Aac6´-Ib-cr-F	ATGACTGAGCATGACCTT	528	(207)
Aac6´-Ib-cr-R	GAAGGGTTAGGCATCACT		
Aac3´-IIa-F	TGCCTCACTTAAAGCGATTG	500	(208)
Aac3´-IIa-R	CAAGCATCGGCATCTCATAC		
TEM-F	ATGAGTATTCAACATTTCCG	867	(206)
TEM-R	CTGACAGTTACCAATGCTTA		
OXA-F	CAGCAGCGCCAGTGCATC	694	(208)
OXA-R	TCCTGTAAGTGCGGACAC		

**Tabla 17.** Cebadores utilizados para la amplificación de co-determinantes de resistencia (TIB Molbiol).

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tm esperado (pb)	Referencia
IutA-F	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	300	(50)
IutA-R	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG		
HlyA-F	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1177	(209)
HlyA-R	ACAATATAAGCGGTCATTCCCGTCA		
Iss-F	CAGCAACCCGAACCACTTGATG	323	(210)
Iss-R	TTCTGCCGCTCTGGCAATGCT		
Iron-F	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	665	(210)
Iron-R	GACGCCGACATTAAGACGCAG		

**Tabla 18.** Cebadores utilizados para la amplificación de genes de virulencia (TIB Molbiol).

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tm esperado (pb)	Referencia
PemK-up	AACGAGAATGGCTGGATGC	232	(211)
PemK-low	CCAACGACACCGCAAAGC		
CcdA-up	AGGAAGGGATGGCTGAGGT	230	(211)
CcdB-low	GGTAAAGTTCACGGGAGAC		
ParD-up	ACGGACCAGCAGCACCAG	534	(211)
ParE-low	AGCCCTTGAGCCTGTCCG		
VagC-up	GGGACCTGGATTTTGATGG	210	(211)
VagD-low	GAGCAGATGTTGGTGTCG		
Hok-up	AGATAGCCCCGTAGTAAGTT	203	(211)
Sok-low	GATTTTCGTGTCAGATAAGTG		
PndC-up	TCAATCAACCAGGGCTCT	140	(211)
PndA-low	CCTCACCATCCAGACAAAA		

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tm esperado (pb)	Referencia
SrnB-up	ACTGATTGTAGCCTCTTCTTT	171	(211)
SrnC-low	CACCACTGTATTTCCCCTGT		
RelE-up	AAAAACCCGATGGCGACAG	370	
RelE-low	TGATAGACCAGGCGAAAAC		

**Tabla 19.** Cebadores utilizados para la amplificación de sistemas de adicción (TIB Molbiol).

### 3.1.7. Equipos

- Cabina deseguridad BIO-II-A (Telstar).
- Cámara de fotos digital Kodak DC290 (Eastman Kodak).
- Cubetas de electroforesis Sub-Cell GT (Bio-Rad).
- Equipo de electroforesis en campo pulsante CHEF- Mapper (Contour-clamped Homogeneous Electric Field) (Bio-Rad).
- Equipo de documentación de imágenes Gel Doc XR (Bio-Rad).
- Fuente de alimentación modelo 1000-500 (Bio-Rad, Hercules, Canadá).
- Kit de purificación de ADN (Qiagen).
- Microcentrífuga Biofuge Fresco (Heraeus).
- Secuenciador ABI PRISM 377 (Applied Biosystems).
- Termociclador Gene Cyclor (Bio-Rad).
- Sistema semiautomatizado de identificación y antibiograma Wider® (Francisco Soria Melguizo) y Microscan WalkAway® (Siemens).
- Hybrigene (Techne).
- UVC500 Crosslinker (HoferPharmaciaBiotech).

- 
- Micro Pulser TM electroporator (Bio-Rad).

### **3.1.8. Software**

- Bio-Rad Canada QuantityOne® Software.
- Fingerprinting II SW software (Biorad).
- 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>).
- SPSS software (version 17.0).

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1. Aislamiento e identificación de aislados**

Los aislados se obtuvieron tras el procesamiento de las muestras según los protocolos establecidos.

#### **3.2.1.1. Colección prevalencia**

La identificación de los aislados se realizó mediante paneles comerciales según las condiciones del fabricante. En el HUVM se llevó a cabo con el sistema comercial Wider® (Francisco Soria Melguizo) y en el HUVR con el equipo de MicroScan WalkAway® (Siemens).

### 3.2.1.2. Colección histórica

La identificación de los aislados se hizo mediante paneles comerciales Vitek® (Biomérieux) en el período 2001-2004 y Wider® (Farnisco Soria Melguizo) en el período 2005-2009.

### 3.2.2. Detección de marcadores moleculares mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Mediante la técnica de la PCR se obtiene la amplificación (aproximadamente  $10^6$  copias) de un fragmento de ADN. Para su posterior estudio se visualizaron los productos en geles de agarosa y se secuenciaron, si procedía.

En condiciones generales, la mezcla de los reactivos se hizo según se indica:

Reactivo	Volumen/ reacción
Cebadores	2,5 µl/cebador
MgCl <sub>2</sub>	2 µl
dNTPs	4 µl
Tampón <i>Taq</i> 10X	5 µl
<i>Taq</i> polimerasa (Invitrogen®)	0,2 µl
H <sub>2</sub> O ultrapura grado MilliQ estéril c.s.p.	48 µl

**Tabla 20.** Volúmenes y Concentración final de cada reactivo.

El volumen final es de 48 µl, al cual se le adicionan 2 µl de la solución que contiene el ADN. Este puede obtenerse a partir de purificaciones o de colonias frescas crecidas en placa.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en termocicladores Thermalcycler 2720 (Applied Biosystems), siguiendo el programa general que se muestra a continuación:

---

Temperatura	Proceso	Tiempo	Nº ciclos
94 °C	Desnaturalización	5 min	1
95 °C	Desnaturalización	30 s	
Según cebadores	Hibridación	30 s	30
72 °C	Extensión	7 s	
7 °C	Extensión final	5 min	1

---

Tabla 21. Condiciones generales de PCR.

### 3.2.3. Detección de ST131. Colección de prevalencia e histórica

Se han descrito métodos rápidos y específicos para la detección de *E. coli* ST131, entre los que se incluyen la rep-PCR (212), el análisis SNP de *mdh* y *gyrB* junto con O25b *rfb* (153) y la PCR del alelo 3 del gen *pabB* (35), siendo esta última la que hemos elegido en nuestro estudio.

Para detectar aislados pertenecientes al secuenciotipo ST131 nosotros utilizamos la siguiente combinación:

#### 3.2.3.1. Detección del serogrupo O25b

Las cepas de *E. coli* se pueden clasificar en base a los antígenos “O” (antígeno somático), “K” (antígeno capsular) y “H” (antígeno flagelar), lo cual da lugar a los distintos serogrupos y serotipos.

La síntesis del antígeno somático “O” está regulada por un grupo de genes denominado *rfb*, siendo la variabilidad de su extremo 5´ la que diferencia los distintos serogrupos.

Tanto los aislados de la colección de prevalencia, los cuales se recogían semanalmente, como los de la colección histórica, se sometieron a cribado mediante PCR de O25b con cebadores específicos para el antígeno “O” variante b (tabla 8), según lo descrito por Clermont (204).



### 3.2.3.2. Detección del alelo 3 del gen *pabB*

La detección del alelo 3 del gen *pabB*, específico de los aislados del clon ST131, se realizó en todos aquellos aislados en los que detectamos la variante b del serogrupo O25. Se llevó a cabo mediante PCR con los cebadores que se indican en la tabla 9.

### 3.2.3.3. Análisis de filogrupo

El análisis de filogrupo se realizó mediante PCR con cebadores específicos (Tabla 10) para los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento de ADN *TspE4.C2*. La interpretación de los resultados se llevó a cabo según lo descrito por Branger (tabla 22) (213); los aislados del secuenciotipo ST131 pertenecen al filogrupo B2 subgrupo B2<sub>3</sub>, es decir, presentan los 3 genes marcadores. Debido a diferencias entre los resultados del serogrupo, filogrupo y perfil genético de algunos aislados, se repitió la PCR de filogrupo, comentada anteriormente en la introducción, con otro set de cebadores (Tabla 11), entre los que se incluyen los de un control interno.

<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>TspE4.C2</i>	Filogrupo
-	-	-	A <sub>0</sub>
-	+	-	A <sub>1</sub>
+	+	-	B2 <sub>2</sub>
+	+	+	B2 <sub>3</sub>
+	-	-	D <sub>1</sub>
+	-	+	D <sub>2</sub>

Tabla 22. Interpretación del filogrupo según Branger (Branger, EID 2005).

Los aislados con resultado positivo en la detección de O25b, *pabB3*, *chuA*, *yjaA* y *TspE4.C2* se consideraron como pertenecientes al secuenciotipo ST131.

---

## 3.2.4. Estudio de sensibilidad a antimicrobianos

### 3.2.4.1. Colección de prevalencia

La sensibilidad a los antimicrobianos se determinó mediante la técnica de microdilución en caldo con paneles comerciales, los cuales presentan diferentes concentraciones de antimicrobianos liofilizados. En el caso de todos los aislados procedentes del HUVM, el estudio de sensibilidad se realizó con el sistema automatizado Wider® (Francisco Soria Melguizo), y con el equipo MicroScan WalkAway® (Siemens) para aquellos aislados del HUVR.

### 3.2.4.2. Colecciones histórica y Lisboa

Para aquellos aislados de la colección histórica cuyo perfil de sensibilidad obtenido por microdilución con paneles comerciales no se pudo recuperar debido a dificultades técnicas y, para los pertenecientes a la colección Lisboa, se utilizó la técnica de difusión en agar o método de Kirby-Bauer.

Los puntos de corte que se utilizaron para determinar la categoría de sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) de un microorganismo fueron los recomendados por el Comité Americano CLSI 2010 (214).

## 3.2.5. Métodos fenotípicos para la detección de enzimas BLEE

Los aislados que presentaron sensibilidad disminuida a cefalosporinas de 3ª generación se estudiaron para conocer si eran productores de BLEE. Se utilizó la técnica de doble disco recomendada por el CLSI, que consiste en enfrentar discos de cefotaxima y ceftazidima (30 µg) con cefotaxima/clavulánico y ceftazidima/clavulánico (30/10 µg) en agar Muller-Hinton, previamente inoculado con una suspensión de microorganismo cuya turbidez es equivalente a 0,5 McFarland.

La interpretación de los resultados se realizó según dicho comité, el cual establece que el aislado es productor de BLEE si hay una diferencia mayor de 5 mm entre el halo de inhibición de la cefalosporina y el de la combinación de dicha cefalosporina con ácido clavulánico.

### 3.2.6. Caracterización de enzimas BLEE

#### 3.2.6.1. PCR de genes *bla*

Para la determinación del tipo de BLEE se hicieron PCR de los genes *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub> y *bla*<sub>SHV</sub> a un grupo de aislados seleccionados. Se utilizaron los cebadores específicos para cada familia que se indican en la tabla 12.

##### 3.2.6.1.1. [Colección prevalencia](#)

Se hizo PCR a los 161 aislados cuya determinación de BLEE por métodos fenotípicos había sido positiva, de los cuales 38 eran ST131.

##### 3.2.6.1.2. [Colección histórica BLEE](#)

Se estudiaron 16 aislados ST131 productores de BLEE.

#### 3.2.6.2. Secuenciación de genes *bla*

##### 3.2.6.2.1. [Aislamiento de ADN a partir de geles de agarosa.](#)

Para recuperar el ADN del gel de agarosa se colocó dicho gel en el transiluminador, se irradió con luz UV y se cortaron los fragmentos de agarosa que contenían las bandas. Se guardaron en tubos de Eppendorf de 1,5 ml y se conservaron a -20 °C hasta proceder a su purificación.

##### 3.2.6.2.2. [Purificación de ADN](#)

La purificación de ADN se llevó a cabo con el kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Una vez obtenidos los productos purificados, se comprobó la presencia de los genes *bla* mediante una electroforesis en gel de agarosa. Tras confirmarse, se llevó a cabo la

---

secuenciación por la empresa Macrogen. Al recibir las secuencias, se analizaron con el programa Chromas y se compararon con el programa BLAST del *National Center for Biotechnology Information site* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)).

### 3.2.7. Estudio de la relación clonal mediante PFGE

Esta técnica se emplea para separar moléculas de ADN de tamaño superior a 20 kb, que la electroforesis en gel de agarosa no puede separar, mediante la aplicación de campos eléctricos que regularmente cambian de dirección. Esta alternancia de campos provoca que las moléculas de ADN cambien de conformación y se orienten en función del campo generado, permitiendo su migración en una trayectoria zig-zag a lo largo del gel.

La enzima de restricción que utilizamos fue *Xba*I, una endonucleasa tipo II, es decir, una enzima que rompe el enlace fosfodiéster de la doble cadena de ADN mediante el reconocimiento de secuencias palindrómicas del ADN, sin necesidad de utilizar ATP. EL proctocolo que seguimos fue el de Pulsenet (<http://www.pulsenetinternational.org/protocols/pfge.asp>). Y el equipo para hacer la electroforesis, el denominado CHEF-DR III Systemapparatus (BioRad Laboratories), en el cual el campo eléctrico es generado por 24 electrodos equidistantes entre sí y dispuestos en un contorno hexagonal. Los electrodos que determinan el ángulo seleccionado (60-120°) tienen mayor potencial que el resto, lo que origina un campo homogéneo a lo largo de todo el gel.

Las condiciones de electroforesis fueron 14° de temperatura, un ángulo de 120° y un voltaje de 6V/cm. Los rangos de pulsos se distribuyeron en dos bloques, según se indica en la tabla 23:

Bloque	Pulso inicial (seg)	Pulso final(seg)	Tiempo (h)
1	1	15	7
2	15	35	16

Tabla 23. Distribución de los pulsos en la electroforesis de campo pulsado.

Tras la electroforesis, se retiró la bandeja con el gel y se introdujo en una cubeta con bromuro de etidio (1µg/ml) durante aproximadamente 30 min. Una vez transcurrido este tiempo, se lavó con agua ultrapura grado Milli-Q el mismo tiempo que la tinción, se visualizó

el gel con el transiluminador de luz UV y se realizó la foto con la cámara de fotos digital Kodac DC 290 (Eastman Kodak).

El estudio de la relación clonal se hizo a los siguientes aislados, seleccionándolos de manera aleatoria y representativos del total de muestras:

#### **3.2.7.1. Colección prevalencia**

- Aislados productores de BLEE y ST131 (n=37).
- Aislados productores de BLEE(n=25).
- Aislados ST131 no productores de BLEE (n=25).

#### **3.2.7.2. Colección histórica**

Se hizo PFGE a todos aquellos aislados pertenecientes al clon ST131:

- Colección Enero (n=16)
- Colección Bacteriemia (n=7)
- Colección BLEE (n=12)

#### **3.2.7.3. Colección de Lisboa**

Se incluyeron todos los aislados.

#### **3.2.7.4. Colección de Johnson**

Se incluyeron todos los aislados.

#### **3.2.7.5. Interpretación de los resultados**

Para poder comparar los geles, se requirió una normalización de los mismos, para lo cual elegimos la especie *Salmonella braenderup* H9812 como patrón de referencia

---

externo. El software utilizado para el análisis de los pulsotipos fue Fingerprinting 3.0 (Biorad) y generamos los dendogramas utilizando el método de UPGMA, con una tolerancia del 1% y un índice de Dice del 85%.

### **3.2.8. Subtipado de aislados ST131. *FimH***

Se seleccionaron un grupo de aislados ST131 productores de BLEE (n=14) y otro de ST131 no productores de BLEE (n=23) de la colección de prevalencia para realizar la detección del gen *fimH* mediante PCR con cebadores específicos (tabla 13). Posteriormente se hizo la secuenciación según el mismo procedimiento que seguimos para los genes *bla*.

### **3.2.9. Análisis de plásmidos**

La caracterización de los plásmidos se realizó a los dos grupos de aislados que se subtiparon.

#### **3.2.9.1. Transformación**

##### **3.2.9.1.1. Extracción de ADN plasmídico. Método de Takahashi (JCM 1984)**

El ADN plasmídico que se obtiene mediante este método puede ser utilizado para estimar el tamaño del plásmido, para digestiones, transformaciones o PCR. Para ello, se utilizaron las soluciones detalladas en el apartado “soluciones”.

##### **3.2.9.1.2. Inducción de la competencia en células receptoras**

La competencia es el estado fisiológico de la célula en el que es capaz de captar ADN exógeno. Para inducirlo, se hizo un cultivo de *E. coli* DH10B en 5 ml de LB y se dejó crecer toda la noche en agitación. Se añadió a 500 ml de LB en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5-0.6 a 600 nm y tras 2 pasos de “20 min de centrifugación a 4000 rpm-decantación del sobrenadante-lavado con agua fría estéril” y otros 2 con “agua estéril-glicerol al 10%”, se obtuvieron células electrocompetentes.

### 3.2.9.1.3. Transformación por electroporación

Esta técnica permite la transferencia de material genético exógeno al interior celular mediante la aplicación de descargas eléctricas a las bacterias. Con ello, se provocan cambios en el potencial de membrana, alteraciones de la envuelta celular y la formación transitoria de canales iónicos, lo cual permite la entrada de ADN.

Para obtener los transformantes se aplicó un pulso (2.5 kV y 5 ms) con el sistema Micropulser (BioRad) a la mezcla de 50 µl de células competentes y 1µl de plásmido, a la cual se añadió rápidamente 800 µl de medio SOC y se incubó durante 1 h en agitación a 37°. Por último, se pudieron seleccionar al sembrar en placas con medio selectivo de MH con cefotaxima o ceftazidima 2 mg/L.

Se comprobó la existencia del *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, CTX-M-9 y SHV en los transformantes mediante PCR, según lo descrito anteriormente.

### 3.2.9.2. **Caracterización de los grupos de incompatibilidad plasmídica. 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 (Carattoli, EID 2005). Para realizar la amplificación de los replicones mediante PCR, se usaron los cebadores descritos en la tabla 14.

Para el tipado de los plásmidos F se siguió el esquema desarrollado por Vila y cols. en 2010. En la amplificación de los replicones se utilizaron parejas de primers descritas anteriormente, como en el caso de FIA y FIC, si bien en el caso de FIB (el forward) y FII (forward y reverse) se rediseñaron para aumentar la sensibilidad (tabla 15). Todos los plásmidos F se secuenciaron y subtiparon según el esquema FAB, mediante el cual se expresa qué replicones presenta cada plásmido y a qué alelo se asignaron.

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. (215). Se basa en la obtención de un perfil alélico de 5 genes (rep11, ardA, trbA, sogS, pilL) mediante amplificación por PCR simple (tabla 16) y posterior

---

secuenciación, que otorga un ST o secuenciotipo. Los resultados se analizaron en la página web: <http://pubmlst.org/plasmid/primers/incl1.shtml>.

### 3.2.9.3. Co-determinantes de resistencia

Los genes generalmente asociados a la región Multi-Drug-Resistant o MDR, la cual vehiculiza *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, son *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *aac(6')-Ib-cr* y *aac(3)-II* (148). Por lo que se determinó mediante amplificación por PCR con cebadores específicos la presencia de estos determinantes (Tabla 17).

### 3.2.9.4. Factores de virulencia

La secuenciación completa de uno de los plásmidos de un aislado de *E. coli* ST131 reveló la presencia de los siguientes genes de virulencia: *iutA*, *hlyA*, *iron* e *iss* (Zhong, 2012). De ahí que fueran los que quisimos detectar en nuestra selección de aislados. Para ello, se realizó una amplificación por PCR con cebadores específicos (Tabla 18).

### 3.2.9.5. Sistemas de adicción

Se han descrito varios sistemas de adicción en plásmidos que vehiculizan *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y cuyo papel es contribuir a la diseminación del plásmido y a la adaptación al hospedador (145,148). Se estudió mediante PCR con cebadores específicos (tabla 19) la presencia de los genes que codifican los sistemas toxina/antitoxina: PemK-PemI “plasmid emergency maintenance”, CcdA-CcdB “coupled cell division locus”, RelB-RelE “relaxed control of stable RNA synthesis”, ParD-ParE “partitoning system”, VagC-VagD “virulence-associated protein”; y los que están regulados por ARN antisentido: Hok-Sok “host-killing, PndA-PndC (promotion of nucleic acid degradation) y SrnB-SrnC “stable RNA”.

### 3.2.9.6. Restricción de ADN plasmídico

- Digestión de plásmidos con *EcoRI*.

Se añadió a 10 µg de ADN obtenido mediante el método Takahashi 4 µl de *EcoRI*, 3 µl de Buffer y 13 µl de agua. Se incubó durante 1 h en un baño a 37°C.



- Se corrió en un gel al 0,8% y se utilizó como marcador de peso molecular *E. coli* 50192.

### 3.2.10. Métodos informáticos

El análisis de los pulsotipos se llevó a cabo con el Fingerprinting II SW software (Biorad, Hercules, CA, USA).

El sistema de análisis digitales Kodak 1D EDAS290 (Eastman Kodak) se utilizó para el estudio de las fotografías de los geles.

Para el análisis comparativo de secuencias se utilizaron los siguientes softwares:

1. Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>)
2. BLAST (Altschul SF., Gish W. y cols., 1990)  
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
3. Transeq (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/index.html>)

### 3.2.11. Métodos estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el SPSS software (version 17.0; SPSS, Chicago, Illinois, United States). La comparación de proporciones de datos no apareados se realizaron mediante el test de la Chi cuadrado (o Fisher si procede), y las continuas mediante el test de la U de Mann-Whitney, según procedió.



## 4. Resultados



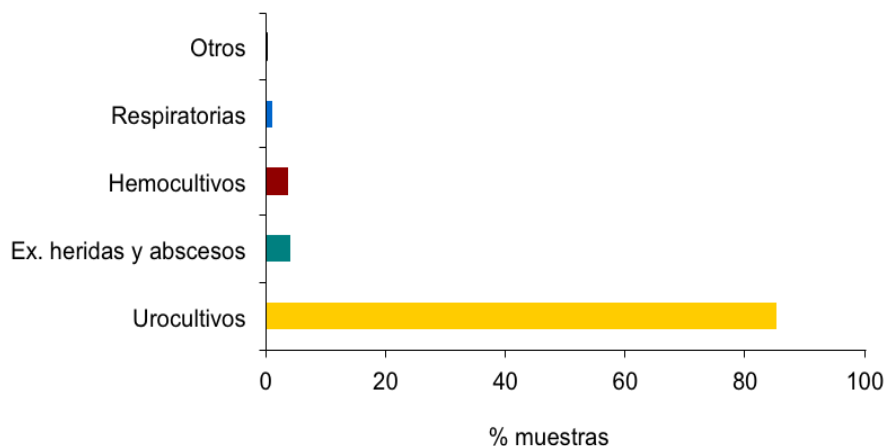
## 4.1. Análisis de la prevalencia del clon ST131 en el área de Sevilla

Durante el año 2010 se recogieron 1.617 (38%) aislados de *E. coli* en el HUVM y 2.691 (62%) aislados procedentes del HUVR, lo cual supone un total de 4.308 aislados de *E. coli*. En la figura se puede observar que de éstos, 3.499 (81%) aislados procedían de muestras de origen comunitario, 692 (16%) nosocomial, y de 117 (3%) se desconocía la procedencia (Figura 3).



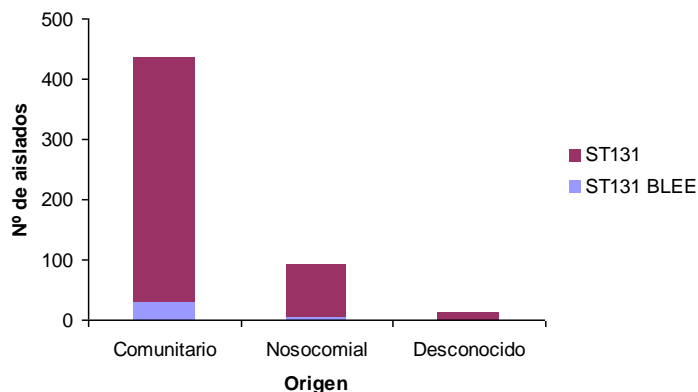
**Figura 3.** Representación del nº de aislados según el servicio peticionario.

La mayoría de los aislados procedía de urocultivos (88,9%), seguida de exudados de heridas y abscesos (6%), hemocultivos (3,9%), muestras de origen respiratorio (1%) y de otra procedencia (0,2%), como se puede observar en la siguiente figura (Figura 4).



**Figura 4.** Distribución de las muestras.

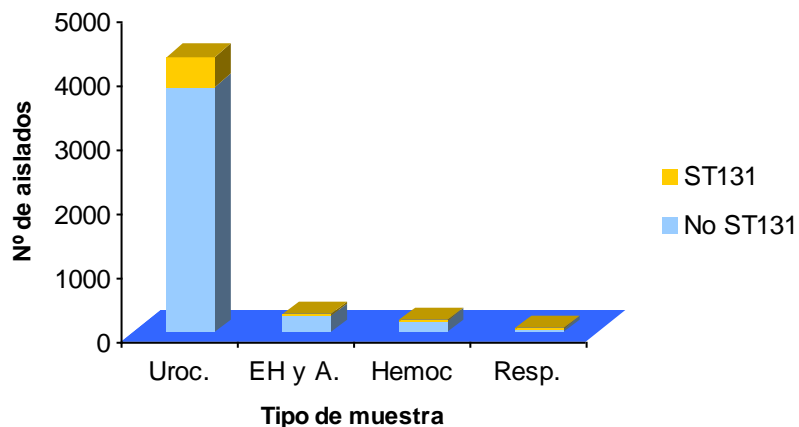
Se caracterizaron 541 (12,5%) aislados como O25b/*pabB3/B2<sub>3</sub>*, por lo que podíamos decir que pertenecían al clon ST131. De estos, 38 (7%) eran aislados productores de BLEE, mientras que 503 (93%) no lo eran. En la figura 5 se puede observar que 436 (80,6%) aislados ST131 eran de origen comunitario, siendo 31 (7,1%) productores de BLEE; 93 (17,2%) procedían del ambiente hospitalario, de los cuales 6 (6,4%) producían BLEE, y 12 (2,2%) tenían origen desconocido.



**Figura 5.** Distribución de aislados ST131 y ST131 productores de BLEE en función del origen.

Respecto al tipo de muestras, 468 (86,6%) eran de origen urinario, 32 (6%) procedían de muestras de exudados de heridas y abscesos, 13 (2,4%) de hemocultivos, 13 (2,4%) de muestras respiratorias y 14 (2,6%) de diversas fuentes. En la figura 6 podemos ver cómo quedan representados los aislados ST131 respecto a los no

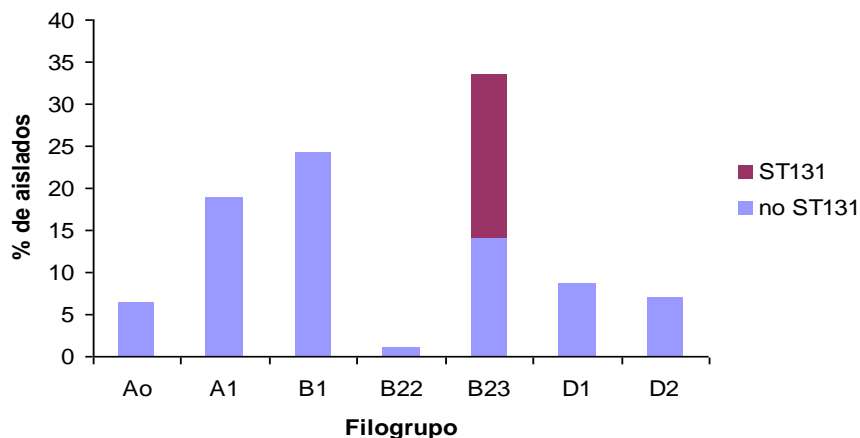
ST131, según cada tipo de muestra. Podemos destacar que 467 (12,3%) urocultivos tenían un aislamiento de *E. coli* ST131.



**Figura 6.** Distribución de aislados ST131 y no ST131 según cada tipo de muestra.

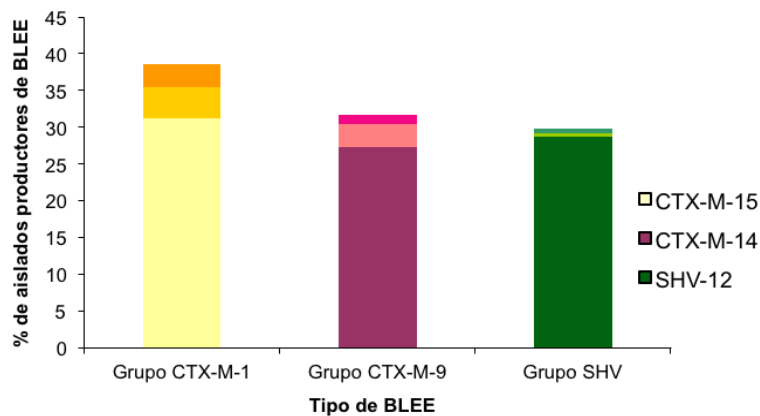
Uroc: Urocultivos; EH y A; Exudados de heridas y abscesos; Hemos: hemocultivos; Resp: muestras respiratorias.

De los 295 aislados de *E. coli* productores de BLEE, 38 (13%) eran ST131. Respecto a la filogenia de todos los aislados productores de BLEE, se puede ver en la figura 7 que pertenecían principalmente a los subgrupos B<sub>23</sub> (33,5%) y B<sub>1</sub> (24,3%), lo cual correspondía al 57,8% del total. Los aislados de los filogrupos A<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, A<sub>0</sub> y B<sub>22</sub> suponían el 18,9%, 8,6%, 7,1%, 6,5% y 0,01%, respectivamente. El 57,5% de los aislados de *E. coli* productores de BLEE del filogrupo B<sub>23</sub> eran ST131. Si se tiene en cuenta el análisis por grupos en lugar de subgrupos, el más frecuente fue B<sub>2</sub> (33,5%), seguido de A (25,4%), B<sub>1</sub> (24,3%) y D (15,7%).



**Figura 7.** Distribución de filogrupos en aislados de *E. coli* productores de BLEE.

Al realizar la caracterización de 161 enzimas BLEE, se obtuvieron porcentajes muy similares entre los grupo CTX-M-1 (38,5%), CTX-M-9 (31,7%) y SHV (29,8%). En la figura 8 puede apreciarse que las enzimas predominantes fueron CTX-M-15 (31,1%), CTX-M-14 (27,3%) y SHV-12 (28,6%), respectivamente, lo que suponía el 87%. No obstante, también se detectaron en menor cuantía otras enzimas, como puede observarse en la tabla 24. Un total de 35 aislados (92,1%) ST131 eran productores de CTX-M-15; dos aislados eran productores de CTX-M-32 (5,3%) y uno (2,6%) de CTX-M-14.



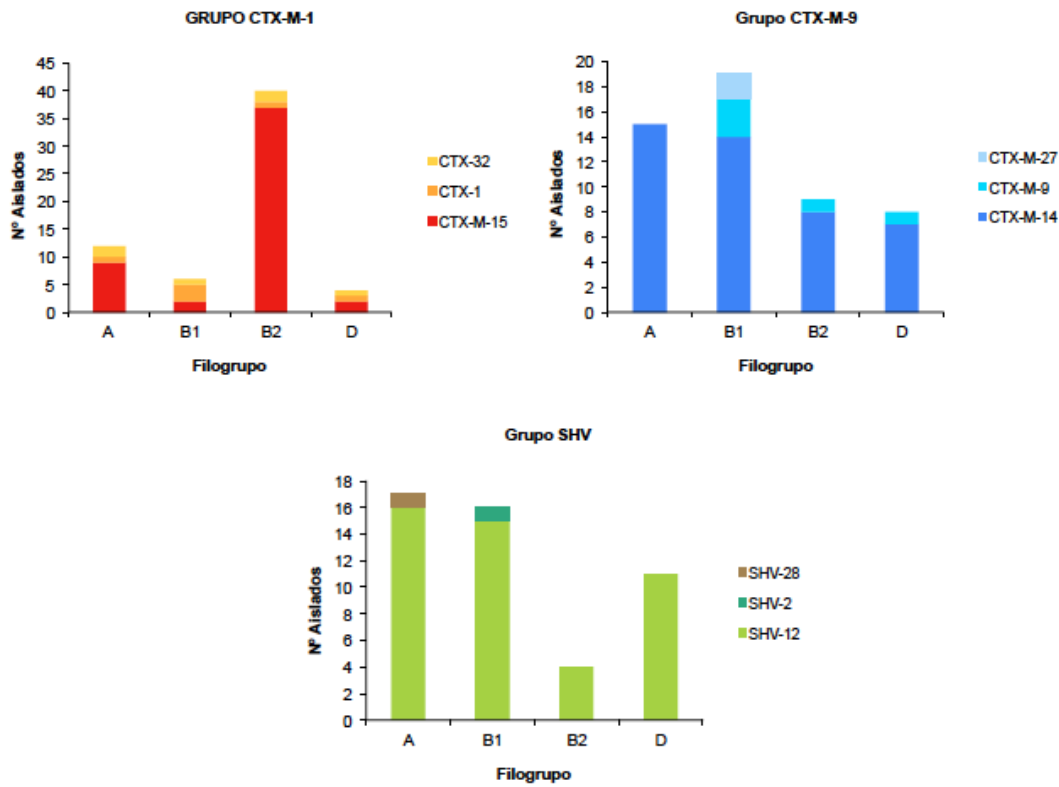
**Figura 8.** Distribución de los aislados en función del tipo de BLEE.



Tipo de BLEE	Nº de aislados	%
<b>Grupo CTX-M-1</b>	62	38,5
CTX-M-15	50	31,1
CTX-M-1	7	4,3
CTX-M-32	5	3,1
<b>Grupo CTX-M-9</b>	51	31,7
CTX-M-14	44	27,3
CTX-M-9	5	3,1
CTX-M-27	2	1,2
<b>Grupo SHV</b>	48	29,8
SHV-12	46	28,6
SHV-28	1	0,6
SHV-2	1	0,6

**Tabla 24.** Frecuencia de los los aislados productores de BLEE por grupo.

En la figura 9 se puede ver la distribución de los filogrupos según cada grupo de BLEE. En el caso del grupo CTX-M-1, se observa que los aislados productores de CTX-M-15 (50 aislados) pertenecen de forma predominante al filogrupo B2, de los cuales el 70% (35 aislados) era ST131. Tanto en el grupo de CTX-M-9 como de SHV, las enzimas más frecuentes son CTX-M-14 y SHV-12, respectivamente. Aunque estas se encuentran en todos los filogrupos, pertenecen principalmente a los filogrupos A<sub>1</sub> y B1. Todas las enzimas pertenecientes al filogrupo B2, a su vez, estaban clasificadas en el subgrupo B2<sub>3</sub>, excepto una SHV-2 que pertenecía al subgrupo B2<sub>2</sub>.



**Figura 9.** Distribución de los aislados según filigrupo y grupo de BLEE.

#### 4.1.1. Sensibilidad a antimicrobianos

Dentro del grupo de aislados no productores de BLEE, se compararon los perfiles de sensibilidad de los aislados ST131 con los no ST131. Podemos observar en la tabla 25 que los aislados ST131 resultaron ser más resistentes de manera muy significativa a amoxicilina-clavulánico, amikacina, gentamicina y tobramicina, ácido nalidíxico y ciprofloxacino que los no ST131 ( $p < 0,001$ ).

	Aislados no productores de BLEE		
	% de resistencia		
Antimicrobiano	No ST131	ST131	p
Amoxicilina-clavulánico	18	27,6	<b>&lt;0,001</b>
Piperacilina-tazobactam	4,9	5,5	0,643
Gentamicina	7,7	17	<b>&lt;0,001</b>
Tobramicina	7,9	20,2	<b>&lt;0,001</b>
Amikacina	0,1	1,2	<b>&lt;0,001</b>
A. nalidixico	40,9	76,1	<b>&lt;0,001</b>
Ciprofloxacino	32,6	72,8	<b>&lt;0,001</b>
Trimetoprim-sulfametoxazol	30,3	33,1	0,165
Fosfomicina	1,1	1,1	0,996

**Tabla 25.** Comparación de los perfiles de sensibilidad entre aislados no productores de BLEE no ST131 y ST131.

Hicimos también la comparación de los perfiles de sensibilidad de los aislados no ST131 productores de BLEE y ST131 productores de BLEE, detectando que los aislados ST131 productores de BLEE resultaron ser más resistentes que los no ST131 productores de BLEE a amoxicilina-clavulánico, amikacina, tobramicina de forma muy significativa ( $p < 0,001$ ) y a ciprofloxacino ( $p = 0,022$ ) de forma significativa (Tabla 26). En la figura 12 se puede observar la distribución de los aislados ST131 BLEE y no ST131 BLEE resistentes a los antimicrobianos para los que se hallaron diferencias significativas.

	Aislados productores de BLEE		
	% de resistencia		
Antimicrobiano	No ST131	ST131	p
Amoxicilina-clavulánico	28,6	82,4	<b>&lt;0,001</b>
Piperacilina-tazobactam	6,2	16,7	0,055
Gentamicina	21,5	3,3	0,014
Tobramicina	19,9	80	<b>&lt;0,001</b>
Amikacina	1,3	28	<b>&lt;0,001</b>
A. nalidíxico	94,4	100	0,377
Ciprofloxacino	81,5	97,1	<b>0,024</b>
Trimetropim-sulfametoxazol	49,4	64,7	0,094
Fosfomicina	3,3	3,3	1,000

**Tabla 26.** Comparación de los perfiles de sensibilidad entre aislados no ST131 BLEE y ST131 BLEE.

#### 4.1.2. Estudio de la relación clonal

Tras realizar PFGE a los 87 aislados seleccionados, los pulsotipos se distribuyeron según el número de aislado por pulsotipo (ver tabla 27):

- 13 pulsotipos múltiples (26%), con más de un aislado por pulsotipo, contenían 50 (57,5%) aislados.
  - 3 pulsotipos (A, B, C) contaban con 10, 8 y 4 aislados, respectivamente. En total, 22 aislados.
  - 10 pulsotipos (D-N) englobaban a 2-3 aislados cada uno, lo que sumaba un total de 28 aislados.
- 37 pulsotipos únicos (74%), con un aislado por pulsotipo, contenían el 42,5% de los aislados.

	Nº de pulsotipos	Nº de aislados
<b>Pulsotipos múltiples</b>	13	50
2-3 aislados	10	22
>3 aislados	3	28
<b>Pulsotipos únicos</b>	37	37

**Tabla 27.** Distribución de los aislados por pulsotipo.

Dentro de los pulsotipos múltiples se encontraba el 68% de los aislados productores de CTX-M-15.

Se obtuvieron 50 pulsotipos con un índice de similitud del 94%, tal y como se puede observar en el dendograma (Figura 10).

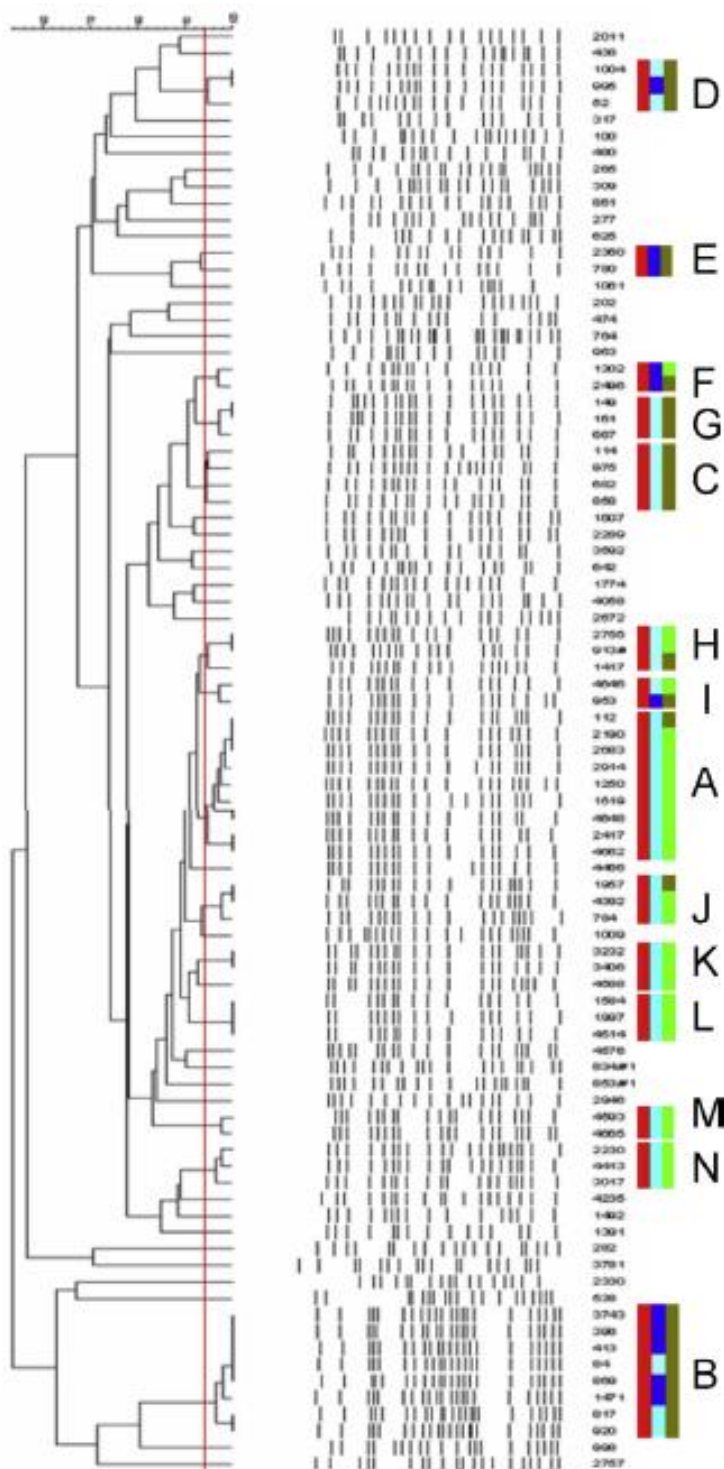
Cabe destacar que en la **zona central** del dendograma se puede apreciar el agrupamiento de 28 aislados, en su mayoría productores de BLEE y resistentes a FQ, en torno a 8 pulsotipos múltiples:

- 1 pulsotipo (A) incluye 9 aislados, de los cuales 8 producen BLEE y resistentes a FQ y uno no produce BLEE y resistentes a FQ.
- 4 de los pulsotipos (K, L, M, N) contienen en total 11 aislados productores de BLEE y resistentes a FQ.
- 2 pulsotipos (H, J) tienen 3 aislados cada uno, todos resistentes a FQ, pero 4 productores de BLEE y 2 no productores.
- 1 pulsotipo (I) con dos aislados: uno resistente a FQ y BLEE y el otro sensible a FQ y no BLEE.

En la **zona inferior** del dendograma se puede distinguir un pulsotipo (B) con 8 aislados: todos son no productores de BLEE, mientras que 3 son resistentes a FQ y 5 sensible a FQ.

En la **zona superior** del dendograma se pueden ver 5 pulsotipos que engloban a 14 aislados, todos excepto uno son aislados no productores de BLEE:

- 
- 2 de los pulsotipos (G, C) agrupan a 7 aislados, todos resistentes a FQ y no productores de BLEE.
  - 1 pulsotipo (E) con 2 aislados, ambos sensibles a FQ y no productores de BLEE.
  - 1 pulsotipo (F) con 2 aislados, ambos sensibles a FQ, pero uno productor de BLEE y el otro no.
  - 1 pulsotipo (D) con 3 aislados, 2 resistentes a FQ y uno sensible a FQ; y todos no productores de BLEE.



**Figura 10.** Dendograma obtenido tras realizar PFGE con *Xba*I de aislados ST131. Los aislados que presentaron el mismo pulsotipo ( $< 3$  bandas de diferencia e índice de semejanza  $> 94\%$ , señalado por línea roja) se corresponden con el cuadrado rojo. El cuadrado verde claro indica los productores de BLEE; el cuadrado verde oscuro indica los aislados no productores de BLEE; el cuadrado azul claro señala los aislados resistentes a FQ y el cuadrado azul oscuro los sensibles a FQ.

---

### 4.1.3. Subtipado (*fimH*)

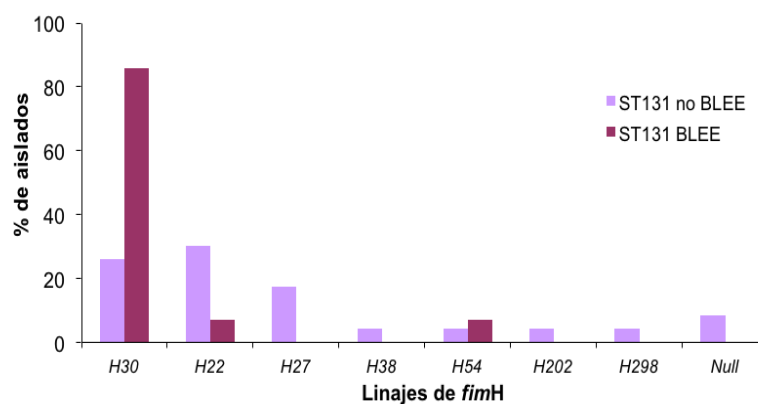
Los aislados fueron seleccionados entre los 23 pulsotipos diferentes, considerando que, aquellos aislados con menos de 3 bandas de diferencia, pertenecían al mismo pulsotipo. De los aislados ST131 se eligieron 8 aislados con pulsotipo único y 15 aislados con pulsotipo múltiple. En el caso de los aislados ST131 productores de BLEE, los elegidos fueron todos con pulsotipo múltiple y productores en su mayoría (13/14) de CTX-M-15. El aislado restante era productor de CTX-M-32. En la tabla 28 se detalla el número de aislados que se eligieron por cada tipo de pulsotipo.

Pulsotipo	ST131 no BLEE (n=23)	ST131 BLEE (n=14)
Único	8	0
Múltiple 2-5 aislados	11	9
Múltiple >5 aislados	4	5

Tabla 28. Distribución de los aislados seleccionados ST131 no productores y productores de BLEE según el pulsotipo.

Tras realizar el análisis de *fimH* a los 37 aislados, obtuvimos 7 alelos: *fimH30*, *fimH22*, *fimH27*, *fimH38*, *fimH54*, *fimH202* y *fimH298*. En los aislados productores de BLEE se identificaron 3 de ellos (*fimH30*, *fimH22*, *fimH54*), mientras que en los aislados ST131 no productores de BLEE hubo mayor diversidad alélica, tal y como se puede ver en la figura 11. Los dos linajes más frecuentes tanto en los aislados ST131 productores como no productores de BLEE fueron H30 y H22. Se hallaron diferencias significativas al comparar los linajes, de modo que H30 era significativamente más frecuente entre los aislados ST131 productores de BLEE que los no productores (85,8% vs. 26,1%;  $p=0,0015$ ); mientras que el linaje H22 era más frecuente entre los aislados ST131 no productores de BLEE respecto a los que sí producían BLEE, aunque la diferencia no fue significativa (30,4% vs. 7,1%;  $p=0,20$ ),





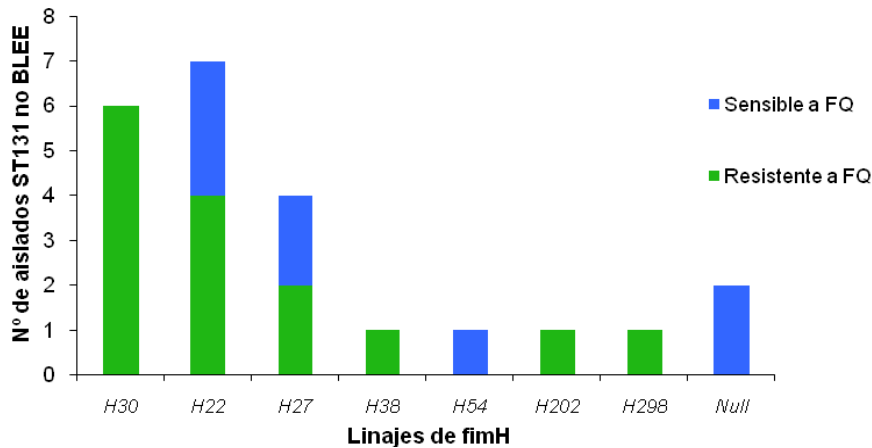
**Figura 11.** Distribución de los alelos de *fimH* en aislados ST131 no productores de BLEE y ST131 productores de BLEE.

En la tabla 29 se puede observar que todos los aislados de los linajes *H38*, *H202*, *H298* y la mayoría (94,5%) de *H30* eran resistentes a FQ. En los linajes *H22*, *H27* y *H54* el 50% de los aislados era sensible y el otro 50% resistente a FQ.

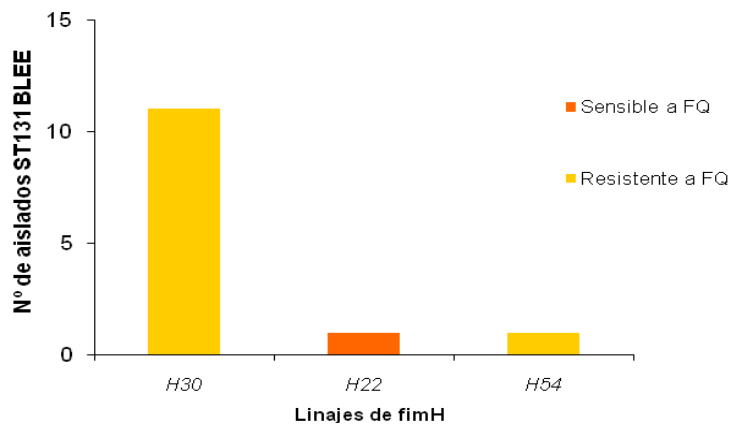
Alelo de <i>fimH</i>	Total de aislados (%)	
	Resistentes a FQ	Sensibles a FQ
<i>FimH30</i>	17 (94,5)	1 (5,5)
<i>FimH22</i>	4 (50)	4 (50)
<i>FimH27</i>	2 (50)	2 (50)
<i>FimH38</i>	1 (100)	0
<i>FimH54</i>	1 (50)	1 (50)
<i>Fim202</i>	1 (100)	0
<i>Fim298</i>	1 (100)	0
Null	0	2 (100)

**Tabla 29.** Distribución de la resistencia a FQ según el alelo de *fimH* en todos los aislados de ST131.

En las figuras 12 y 13 quedan representadas las distribuciones de la sensibilidad a FQ de los aislados ST131 no productores de BLEE y de los aislados ST131 productores de BLEE, respectivamente. En el primer caso, se observa que todos los aislados de los linajes *H30*, *H38*, *H202* y *H298* eran resistentes a FQ, si bien el 43%, 50% y 100% de los aislados pertenecientes a los linajes de *H22*, *H27* y *H54*, respectivamente, eran sensibles. En el caso de los aislados ST131 productores de BLEE, todos los aislados de los linajes *H30* y *H54* eran resistentes a FQ y el único aislado del subclon *fimH22* era sensible.



**Figura 12.** Distribución de la sensibilidad a FQ de los aislados ST131 no productores de BLEE en función de los linajes de *fimH*.



**Figura 13.** Distribución de la sensibilidad a FQ de los aislados ST131 productores de BLEE en función de los linajes de *fimH*.

## 4.2. Animales de compañía

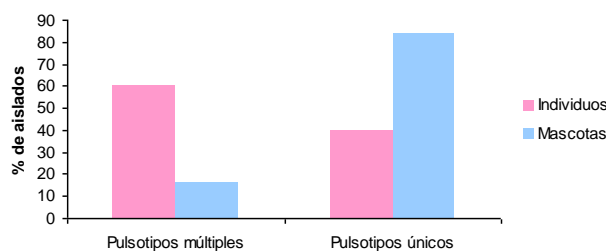
### 4.2.1. Estudio de la relación clonal de aislados portugueses y españoles

En la siguiente tabla quedan recogidos los pulsotipos según el número de aislados por pulsotipo y el número de aislados que presenta cada uno de ellos según su muestra de origen. Se pueden contabilizar 72 pulsotipos únicos, de los cuales 46 procedían de aislados de personas y 21 de animales. Por otro lado, hallamos 21 pulsotipos múltiples, de los cuales 19 tenían 2-5 aislados y 2 incluían más de 5. Excepto 5 aislados que eran de animales, todos procedían de personas.

Pulsotipo	Nº de pulsotipos (N=93)	Nº de aislados (N=146)	Personas (N=115)	Animales (N=31)
Único	72	72	46	26
Múltiple 2-5 aislados	19	54	49	5
Múltiple con >5 aislados	2	20	20	0

**Tabla 30.** Distribución de los aislados según pulsotipo y muestra de origen.

Como se puede ver en la figura 14, hubo más dispersión de los pulsotipos de los aislados procedentes de mascotas (el 84% de los pulsotipos de aislados de origen animal eran únicos), si bien en el caso de los pulsotipos de aislados de origen humano se observó mayor clonalidad (el 60% de los pulsotipos de aislados de origen humano eran múltiples).

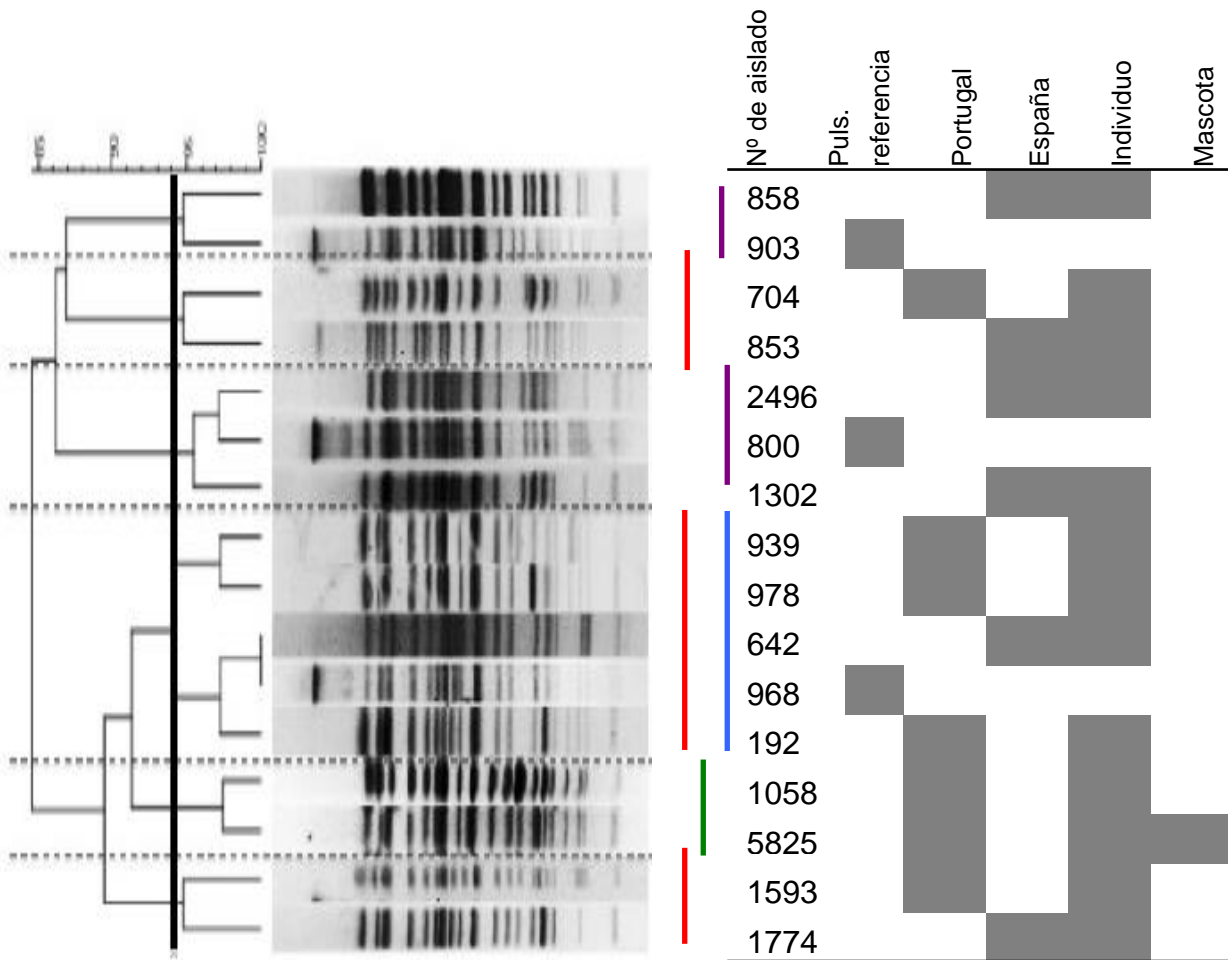


**Figura 4.** Frecuencia de aislados según el pulsotipo y origen de la muestra.

Estudiamos la relación genética de los aislados de ambas zonas junto con 13 de la colección de referencia de Johnson. En la figura 15 pueden distinguirse 6 clusters cuyos

pulsotipos tienen un índice de similitud del 94%. Se observaron las siguientes relaciones entre los aislados:

- 3 clusters incluían pulsotipos de aislados (5,5%) procedentes de ambas zonas geográficas, todos de origen humano, según indican la líneas rojas.
- 2 clusters englobaban 8 pulsotipos de aislados de individuos y de referencia: dos aislados de España tenían un pulsotipo que coincidía con el internacional 800 y otro aislado con el 903 (líneas moradas); los pulsotipos de 3 aislados de Portugal y otro de España lo hacían con el pulsotipo 968 (línea azul).
- Sólo hubo un cluster con un pulsotipo de aislado de origen humano y otro animal (1,3%), ambos portugueses. Está señalado por la línea verde.

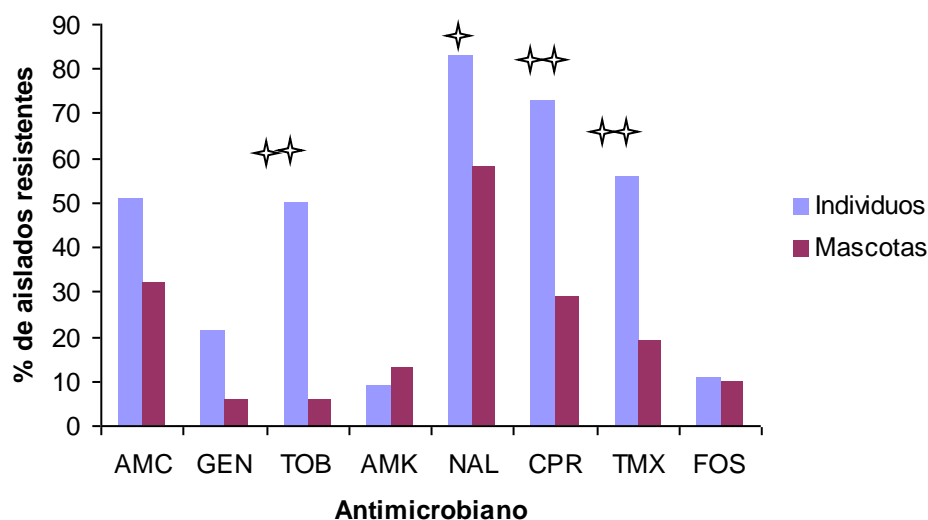


**Figura 15.** Dendrograma obtenido mediante PFGE con *Xba*I de aislados ST131 de muestras clínicas de origen humano y de mascotas, procedentes de España y Portugal, y de aislados de la colección de referencia de Johnson

## 4.2.2. Sensibilidad a antimicrobianos

### 4.2.2.1. Comparación de aislados humanos portugueses y españoles con los aislados de animales de compañía.

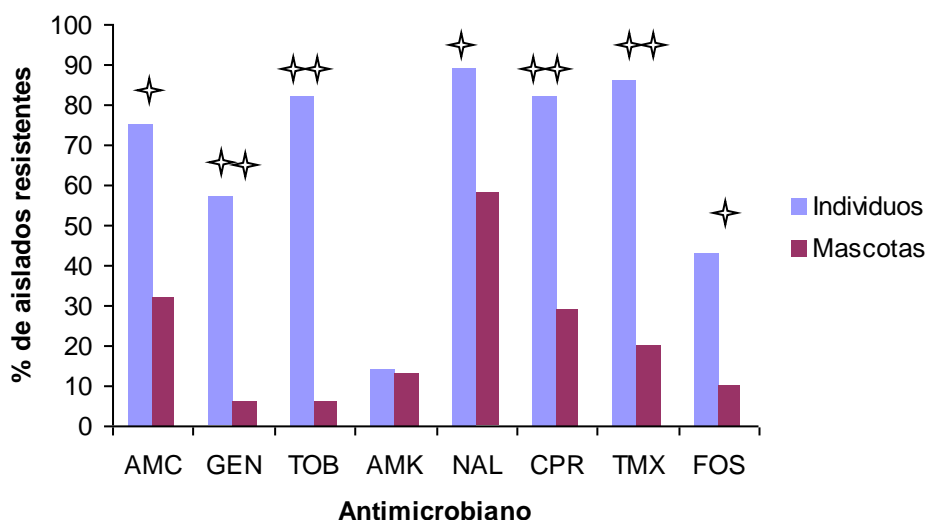
Cuando se compararon los patrones de resistencia a los antimicrobianos de los aislados de individuos de ambas regiones con los de mascotas (figura 16), se observó que los aislados de individuos eran más resistentes de forma muy significativa ( $p < 0,001$ ) a ciprofloxacino, tobramicina y trimetoprim-sulfametoxazol que los de mascotas; mientras que en el caso del ácido nalidíxico fueron diferencias significativas. También es de destacar que la frecuencia de aislados ST131 productores de BLEE fue mayor entre los aislados de personas ( $n=57$ , 49%) que entre los de mascotas ( $n=3$ , 10%;  $p < 0,001$ ).



**Figura 16.** Distribución de aislados ST131 resistentes a los distintos antimicrobianos en función del origen de la muestra. **AMC:** amoxicilina-clavulánico, PT: piperacilina-tazobactam; **GEN:** gentamicina; **TOB:** tobramicina; **AMK:** amikacina; **NA:** ácido nalidíxico **CIP:** ciprofloxacino; **TMX:** trimetoprim-sulfametoxazol; **FOS:** fosfomicina. ✨ Antimicrobianos para los que se hallaron diferencias muy significativas. ✨ Antimicrobianos para los que se hallaron diferencias significativas.

#### 4.2.2.2. Comparación de aislados de individuos con los aislados de animales de compañía, ambos portugueses.

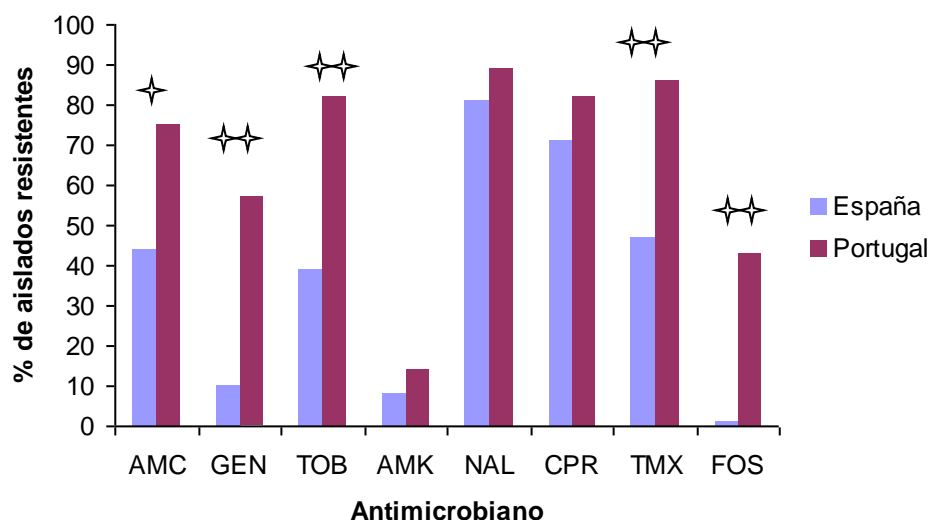
Al comparar los perfiles de resistencia de los aislados de individuos con los de mascotas pertenecientes a Lisboa (figura 17), se observó que los aislados de individuos fueron más resistentes de forma muy significativa ( $p < 0,001$ ) a ciprofloxacino, gentamicina, tobramicina y trimetoprim-sulfametoxazol y de manera significativa a amoxicilina-clavulánico ( $p = 0,002$ ), ácido nalidíxico ( $p = 0,009$ ) y fosfomicina ( $p = 0,006$ ). También es de destacar que la frecuencia de aislados de este clon productores de BLEE era mayor en aislados de individuos ( $n = 20$ , 71 %) que de mascotas ( $n = 3$ , 10%;  $p < 0,001$ ).



**Figura 17.** Distribución de aislados ST131 resistentes a los distintos antimicrobianos en función del origen de la muestra pertenecientes a una misma región. **AMC:** amoxicilina-clavulánico, **PT:** piperacilina-tazobactam; **GEN:** gentamicina; **TOB:** tobramicina; **AMK:** amikacina; **NA:** ácido nalidíxico; **CIP:** ciprofloxacino; **TMX:** trimetoprim-sulfametoxazol; **FOS:** fosfomicina. \* : Antimicrobianos para los que se hallaron diferencias muy significativas. \*\* : Antimicrobianos para los que se hallaron diferencias significativas.

#### 4.2.2.3. Comparación de aislados de individuos españoles y portugueses

Teniendo en cuenta los aislados de individuos tanto de Sevilla como de Lisboa, se hallaron diferencias muy significativas para la gentamicina ( $p < 0,001$ ), tobramicina ( $p < 0,001$ ), trimetoprim-sulfametoxazol ( $p < 0,001$ ) y fosfomicina ( $p < 0,001$ ), y significativas para el amoxicilina-clavulánico ( $p = 0,004$ ), obteniéndose mayor porcentaje de resistencia en el caso de los aislados de personas de Portugal. También se detectaron con más frecuencia aislados productores de BLEE procedentes de Lisboa (71%) respecto a los del área de Sevilla (42%) ( $p = 0,009$ ) (figura 18).



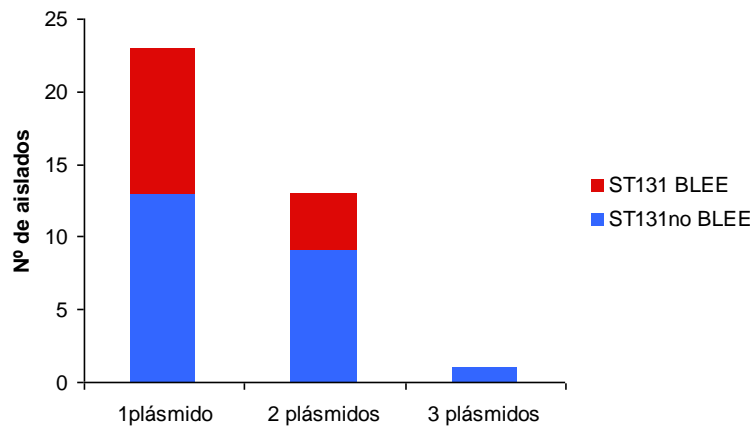
**Figura 18.** Distribución de aislados ST131 resistentes de muestras de origen humano a los distintos antimicrobianos pertenecientes a distintas regiones. **AMC:** amoxicilina-clavulánico, **PT:** piperacilina-tazobactam; **GEN:** gentamicina; **TOB:** tobramicina; **AMK:** amikacina; **NA:** ácido nalidíxico **CIP:** ciprofloxacino; **TMX:** trimetoprim-sulfametoxazol; **FOS:** fosfomicina. : Antimicrobianos para los que se hallaron diferencias muy significativas. : Antimicrobianos para los que se hallaron diferencias significativas.

#### 4.2.3. Caracterización de plásmidos

En total se caracterizaron los plásmidos de los 37 aislados seleccionados. Para la caracterización de los plásmidos de aislados ST131 productores de BLEE, se trabajó con

transformantes, los cuales se consiguieron en 13 de los 14 aislados. En el caso de los aislados ST131 no productores de BLEE no se consiguieron transformantes, por lo que la extracción plasmídica y los estudios consecutivos de caracterización se hicieron directamente del aislado clínico. Se procedió de igual manera con el aislado BLEE que no se pudo transformar.

Como puede observarse en la figura 19, se hallaron 23 aislados (62,2%) con un solo plásmido, de los cuales 13 (56,5%) eran ST131 no productores de BLEE y 10 (43,5%) ST131 productores de BLEE (CTX-M-15). En 13 (35,1%) de los aislados se detectaron 2 plásmidos, siendo 9 (69,2%) aislados no productores de BLEE y 4 (30,8%) productores de BLEE (3 CTX-M-15, 1 CTX-M-32). Hubo un aislado no productor de BLEE (2,7%) en el que se detectaron 3 plásmidos.



**Figura 19.** Distribución del número de plásmidos en cada aislado.

#### 4.2.3.1. Tipado de plásmidos. Grupos de incompatibilidad y replicones

En la tabla 31 se observa que todos los aislados ST131 productores de BLEE (14; 100%) y la mayoría de los aislados no productores de BLEE (22; 96%) contenían al menos un plásmido del grupo de incompatibilidad IncF. El aislado restante (4%) tenía un plásmido perteneciente al grupo Incl. En todos los plásmidos se detectaron más de un replicón F, siendo las combinaciones más frecuentes FII+FIA y FII+FIB con un 43,2% (n=16) cada uno. Al analizar los resultados en función de la producción de BLEE, se obtuvo que en los aislados productores de BLEE los plásmidos presentan con mucha más frecuencia los replicones FII+FIA que en los no productores de BLEE (78,5% vs. 17,4%; p= 0,003). En



cambio, en los plásmidos de aislados no productores de BLEE la combinación FII+FIB fue más frecuente que en los productores de BLEE (60,8% vs.14,3%;  $p = 0,01$ ).

Grupo(s) Inc	Replicon(es)	Nº de aislados (%)				
		ST131 no BLEE (n=23)(%)		ST131 BLEE (n=14) (%)		Total (%)
Inc F	FII+FIA	4	(17)	10	(71)	14 (38,8)
Inc F	FII+FIB	11	(48)	1	(7)	12 (33,3)
Inc F	FII+FIA+FIB	3	(13)	1	(7)	3 (8,3)
Inc F, IncY	FII+FIA+Y	0		1	(7)	1 (2,8)
Inc F, IncN	FII+FIB+N	0		1	(7)	1 (2,8)
Inc F, IncI1	FII+FIB+I1	2	(8)	0		2 (5,6)
Inc F, IncI1	FII+I1	1	(4)	0		1 (2,8)
Inc F, IncP, IncK	FII+FIB+P+K	1	(4)	0		1 (2,8)
Inc I1	I1	1	(4)	0		1 (2,8)
Total IncF		22	(96)	14	(100)	35 (97,2)
	Total FII+FIA	4	(17,4)	11	(78,5)	16 (43,2)
	Total FII+FIB	14	(60,8)	2	(14,3)	16 (43,2)

**Tabla 31.** Distribución de los grupos de incompatibilidad plasmídica y replicones de plásmidos de aislados ST131 no productores de BLEE y ST131 productores de BLEE.

#### 4.2.3.1.1. Subtipado de plásmidos IncF. Esquema FAB.

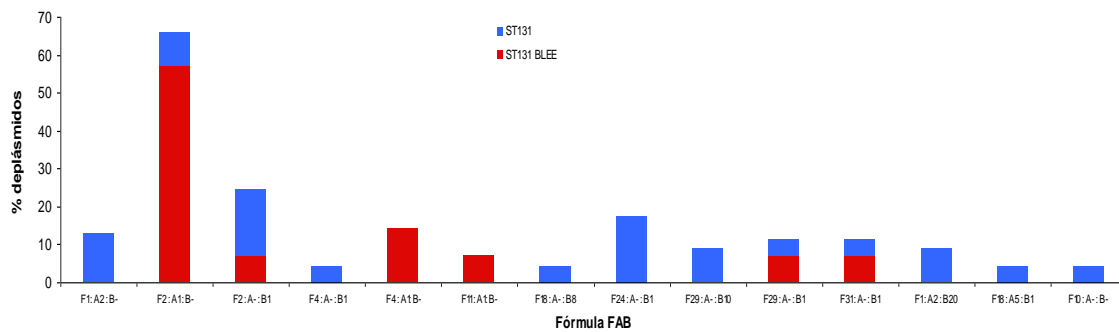
En la figura 20 se puede observar que la fórmula FAB más frecuente en los plásmidos IncF de aislados ST131 productores de BLEE fue F2:A1:B<sup>-</sup> (57%), seguido de F4:A1:B<sup>-</sup> (14,2%). En la misma proporción (7,1%) se encontraron F2:A<sup>-</sup>B1; F11:A1:B<sup>-</sup>; F29:A<sup>-</sup>B1 y F31:A<sup>-</sup>B1. Sin embargo, en los aislados ST131 no productores de BLEE se detectó mayor variabilidad en cuanto al subtipado plasmídico: 23 aislados presentaron 12 subtipos de plásmido diferentes. De éstos, los más frecuentes fueron F2:A<sup>-</sup>B1 (17,4%) y

F24:A:B1 (17,4%), seguido de F1:A2:B- con un 13% y, F2:A1:B-, F29:A:B10 y F1:A2:B20 con un 8,8% cada uno. Los otros 6 subtipos suponían el 4,3% cada uno.

Por otra parte, podemos observar en la tabla 32 que encontramos aislados ST131 tanto productores como no productores de BLEE con el mismo pulstipo y fórmula plasmídica. Así como también identificamos aislados con el mismo pulstipo cuyas fórmulas plasmídicas eran diferentes.

Nº de aislado	Tipo de aislado	Fórmula FAB	Tipo de BLEE	Pulstipo
112	ST131	<b>F2:A1:B-</b>		A
1081	ST131 BLEE	<b>F4:A6:B-</b>	CTX-M-15	A
1619	ST131 BLEE	<b>F2:A1:B-</b>	CTX-M-15	A
2683	ST131 BLEE	<b>F2:A1:B-</b>	CTX-M-15	A
2914	ST131 BLEE	<b>F2:A1:B-</b>	CTX-M-15	A
2190	ST131 BLEE	<b>F4:A1:B-</b>	CTX-M-15	A
1250	ST131 BLEE	<b>F11:A1:B-</b>	CTX-M-15	A
84	ST131	<b>F24:A-B1</b>		B
817	ST131	<b>F24:A-B1</b>		B
869	ST131	<b>F29:A-B1</b>		B
114	ST131	<b>F1:A2:B-</b>		C
682	ST131	<b>F1:A2:B20</b>		C
1004	ST131	<b>F2:A-B1</b>		D
953	ST131	<b>F24:A-B1</b>		I
265	ST131	<b>F2:A-B1</b>		J
309	ST131	<b>F2:A-B1</b>		J
4559	ST131 BLEE	<b>F2:A-B1</b>	CTX-M-32	J

**Tabla 32.** Distribución de los aislados ST131 y ST131 productores de BLEE según la fórmula FAB y pulstipo.



Debido a dificultades técnicas el estudio de los co-determinantes de resistencia, factores de virulencia y sistemas de adicción se llevó a cabo en los plásmidos de 7 aislados ST131 no productores de BLEE y 11 ST131 productores de BLEE.

#### 4.2.3.2. Determinantes de resistencia

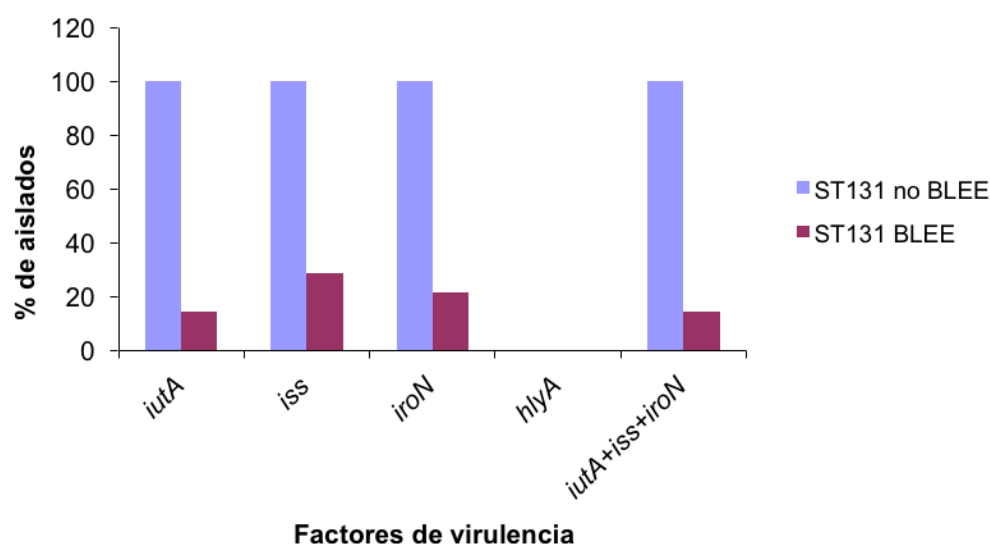
Se realizó la detección de 4 determinantes de resistencia: *aac(6')-Ib-cr*, *aac(3)-Ib-cr*, *bla<sub>OXA-1</sub>*, *bla<sub>TEM-1</sub>*. Como se puede observar en la tabla 33, en los aislados ST131 productores de BLEE se detectó con más frecuencia *aac(6')-Ib-cr* (71,4%) y *bla<sub>OXA-1</sub>* (85,7%) al compararlos con los no productores de BLEE, de los cuales ninguno era portador de dichos genes ( $p < 0,001$ ). En cuanto a los aislados *bla<sub>TEM-1</sub>* positivos no se hallaron diferencias significativas ( $p = 0,88$ ); 3 (42,8%) eran aislados no productores de BLEE y 5 (35,7%) sí lo eran. Se detectaron combinaciones de 2 o 3 determinantes de resistencia entre los aislados ST131 productores de BLEE, aunque sólo la detección simultánea de *aac(6')-Ib-cr* y *bla<sub>OXA-1</sub>* fue significativamente más frecuente que entre los no productores (62,5% vs. 0%;  $p < 0,001$ ). Se detectaron *bla<sub>TEM-1</sub>+bla<sub>OXA-1</sub>* en 4 (25%) de los aislados productores de BLEE, pero en ninguno de los no productores. Solo hubo dos aislados (12,5%) productores de BLEE en el que se detectaron los 3 genes *aac(6')-Ib-cr + bla<sub>OXA-1</sub> + bla<sub>TEM-1</sub>*.

Determinantes de R	Nº (% de aislados)		p	Nº (% de aislados)
	ST131 no BLEE (n=7) (%)	ST131 BLEE (n=14)(%)		Total (n=21)(%)
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	0	10 (71,4)	<0,001	10 (47,6)
<i>aac(3)-Ib-cr</i>	0	0	0	0
<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	0	12 (85,7)	<0,001	13 (61,9)
<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	3 (42,8)	5 (35,7)	0,88	8 (38,1)
<i>aac(6')-Ib-cr+bla<sub>OXA-1</sub></i>	0	10 (62,5)	<0,001	10 (62,5)
<i>bla<sub>TEM-1</sub>+bla<sub>OXA-1</sub></i>	0	4 (25)	0,07	4 (25)
<i>aac(6')-Ib-cr+bla<sub>OXA-1</sub>+bla<sub>TEM-1</sub></i>	0	2 (12,5)	0,40	2 (12,5)

**Tabla 33.** Distribución de determinantes de resistencia en aislados ST131 no productores y productores de BLEE.

#### 4.2.3.3. Factores de virulencia

Al realizar el estudio de los genes de virulencia *iutA*, *iss*, *iroN* y *hlyA*, se observa en la figura 21 que los factores *iutA*, *iss* e *iroN* fueron más prevalentes en aislados no productores de BLEE (100%,100%,100% vs 14,3%, 28,6%, 21,4%;  $p < 0,05$ ). En cuanto a la combinación de *iutA+iss+iroN*, también se encontraron diferencias, siendo más frecuente entre los aislados no BLEE que entre los BLEE (100% vs 14,3%;  $p = 0,001$ ). En cuanto al gen *hlyA*, no se detectó en ninguno de los plásmidos analizados.



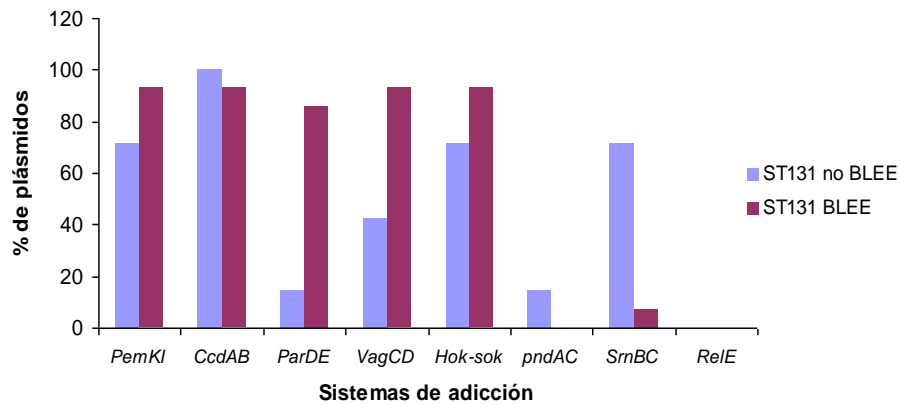
**Figura 21.** Distribución de los genes de virulencia en aislados ST131 no productores y ST131 productores de BLEE.

#### 4.2.3.4. Sistemas de adicción

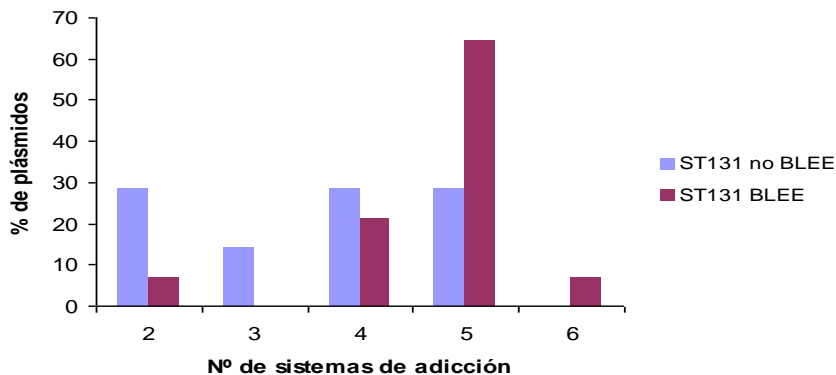
Como puede observarse en la figura 22, en la mayoría de los plásmidos portadores de genes *bla* se detectó *pemKI* (92,8%), *ccdAB* (93,8%), *parDE* (85,7%), *vagCD* (92,8%) y *hok-sok* (92,8%). Solo en el 7,1% de los plásmidos se detectó *srnBC*. En el caso de los aislados ST131 no productores de BLEE, el 100% de los plásmidos era portador de *ccdAB*, el 71,4% tanto de *pemKI*, como de *hok-sok* y *srnBC*; el 42,8% de *vagCD*, el 14,3% de *parDE* y también el 14,3% de *pndAC*. En ninguno de los 21 plásmidos se detectó *relE*. Los aislados productores de BLEE presentaban con mayor frecuencia el gen *parDE* que los no

productores de BLEE (85,7% vs. 14,3%;  $p=0,007$ ). En el caso de *srnBC*, su detección fue más frecuente en los aislados no productores de BLEE que en los aislados ST131 productores de BLEE (71,4 vs. 7,1;  $p=0,01$ ).

Además, se detectaron múltiples combinaciones de varios sistemas de adicción. En la figura 23 se puede observar que en todos los plásmidos se detectaron como mínimo 2 sistemas de adicción, pero los que pertenecían a aislados ST131 productores de BLEE presentaban con más frecuencia (71,4%) la combinación de 5 ó más sistemas de adicción que los aislados ST131 no productores de BLEE (28,5%), si bien la diferencia no fue significativa ( $p=0,16$ ).



**Figura 22.** Distribución de los sistemas de adicción en plásmidos procedentes de aislados ST131 no productores de BLEE y productores de BLEE.



**Figura 23.** Distribución de las combinaciones de los sistemas de adicción en plásmidos procedentes de aislados ST131 no productores de BLEE y productores de BLEE.

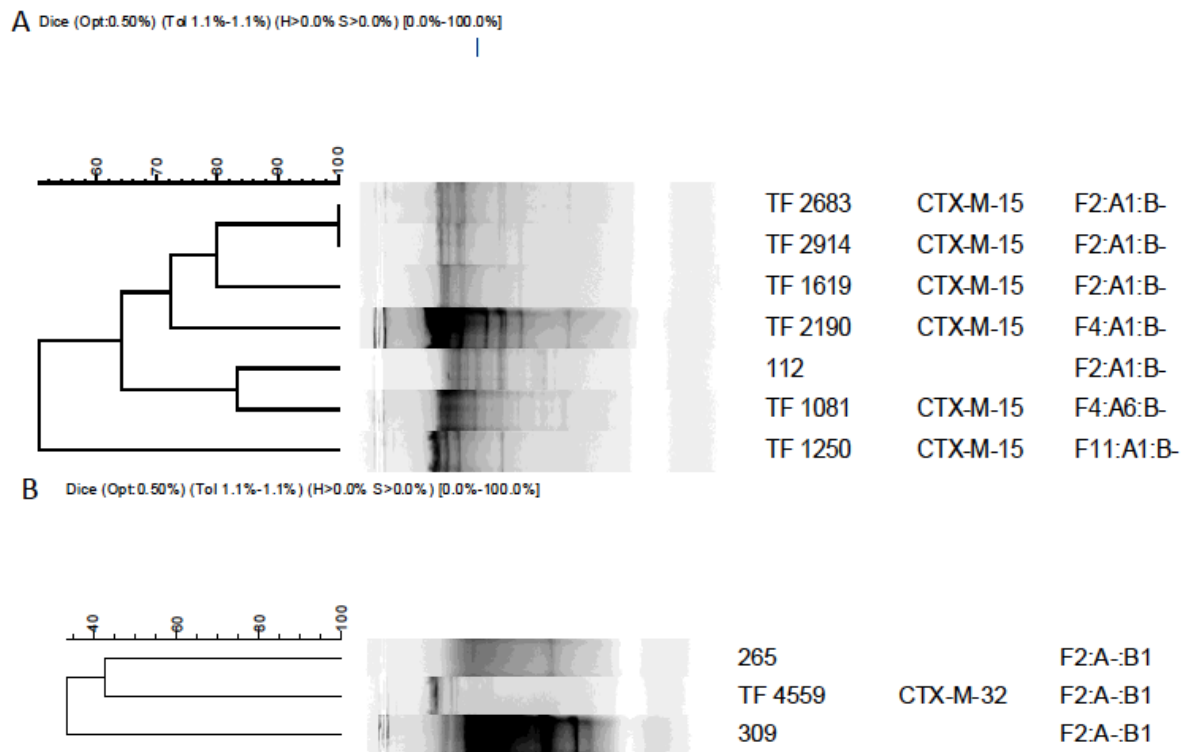
En la tabla 34 se puede observar que no hubo ninguna coincidencia entre las combinaciones de los sistemas de adicción encontradas en plásmidos de aislados de ST131 no productores de BLEE y ST131 productores de BLEE. En los plásmidos de aislados ST131 no productores de BLEE con las mismas combinaciones de sistemas de adicción no hubo relación con el subtipado. Sin embargo, 6 de los 7 del plásmidos cuya fórmula fue F2:A1:B-, contenían la misma combinación de 5 sistemas de adicción (*pemKI*, *ccdAB*, *parDE*, *vagCD*, *hok-sok*).

Fórmulas FAB	Sistemas de adicción								
	<i>PemKI</i>	<i>CcdAB</i>	<i>ParDE</i>	<i>VagCD</i>	<i>Hok-sok</i>	<i>pndAC</i>	<i>SrnBC</i>	<i>RelE</i>	
<b>ST131 no BLEE</b>									
F1:A2:B- (n=1)	+	+	+	-	+	-	+	-	
F2:A-:B1 (n=1)	+	+	-	-	-	-	-	-	
(n=1)	-	+	-	+	+	-	+	-	
F18:A-:B8 (n=1)	+	+	-	+	+	-	+	-	
F18:A5:B1 (n=1)	-	+	-	+	+	-	+	-	
(n=1)	+	+	-	-	-	-	-	-	
F24:A-:B1 (n=2)	+	+	-	-	+	-	-	-	
<b>ST131 BLEE</b>									
F1:A2:B- (n=1)	+	+	+	-	+	-	-	-	
F2:A1:B- (n=6)	+	+	+	+	+	-	-	-	
(n=1)	+	+	+	+	+	-	+	-	
(n=1)	-	+	+	+	+	-	-	-	
F4:A1:B- (n=2)	+	+	+	+	+	-	-	-	
F11:A1:B- (n=1)	+	+	+	+	+	-	-	-	
F18:A-:B8 (n=1)	+	+	-	+	+	-	-	-	
F31:A-:B1 (n=1)	+	-	-	+	-	-	-	-	

**Tabla 34.** Distribución de las combinaciones de los sistemas de adicción según la fórmula FAB de los plásmidos de aislados ST131 no productores de BLEE y productores de BLEE.

#### 4.2.3.5. Relación genética

Tras realizar la digestión con *EcoRI* de los plásmidos de 7 aislados ST131 productores de BLEE y 3 no productores, se obtuvieron los perfiles de restricción que muestra la figura 24. En el caso A se puede observar que aquellos plásmidos con la misma fórmula FAB (F2:A1:B-) y productores de CTX-M-15 presentaban perfiles de restricción muy similares (80% de similitud) o iguales (100%). El plásmido con una variación alélica del replicón FII (F4 en vez de F2) muestra un perfil con un 72% de similitud respecto a los anteriores. Si además se producen cambios en la secuencia del replicón FIA, el porcentaje de similitud disminuye aún más. En el caso B, los plásmidos de 3 aislados (dos no productores de BLEE y uno productor de CTX-M-32) con la misma fórmula FAB (F2:A-:B1) presentan perfiles de restricción con menos del 50% de similitud.



**Figura 24.** Dendrograma obtenido mediante PFGE con *EcoRI* de plásmidos de aislados ST131 no productores y productores de BLEE ST131.



## 4.2.4. Colección histórica

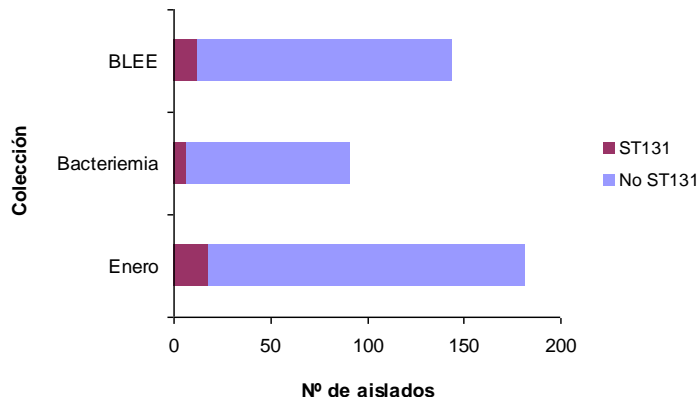
### 4.2.4.1. Prevalencia de ST131

#### 4.2.4.1.1. Prevalencia total de ST131

De los 417 aislados correspondientes al período 2002-2009, 37 (8,8%) se caracterizaron como O25b/*pabB3/B2<sub>3</sub>* (ST131).

#### 4.2.4.1.2. Prevalencia de ST131 según colección

En la figura 25 se observa la distribución de los aislados ST131 según la colección de procedencia. Las colecciones de Enero, Bacteriemia y BLEE contaban con 182, 91 y 144 aislados cada una, de los cuales 18 (9,9%), 7 (7,7%) y 12 (8,3%) pertenecían al clon ST131, respectivamente.

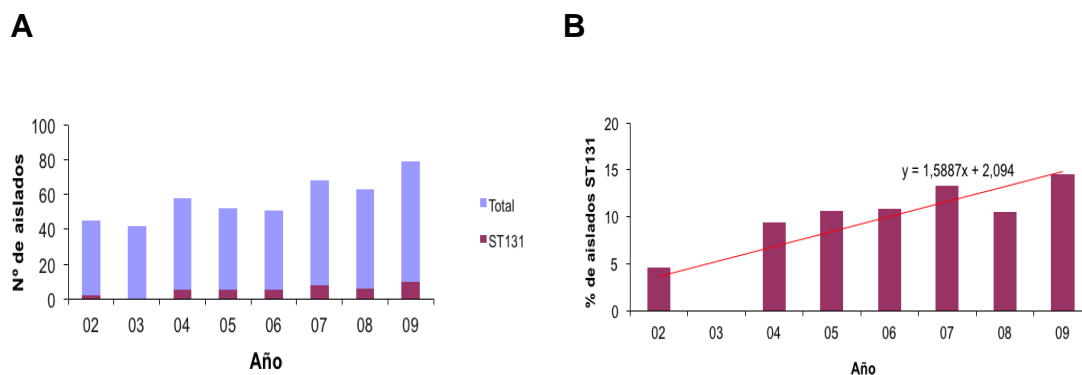


**Figura 25.** Distribución de los aislados ST131 según la colección de procedencia.

#### 4.2.4.1.3. Prevalencia de aislados ST131 según año de aislamiento

Tras analizar la distribución temporal del total de aislados (Figura 26.A), se detectó que los primeros aislados ST131 databan del año 2002, tras el cual dejaron de detectarse durante un año. A partir de 2004 encontramos aislados ST131 todos los años. En la figura 29.B podemos observar que el número de aislados ST131 tiende a ir aumentando con el

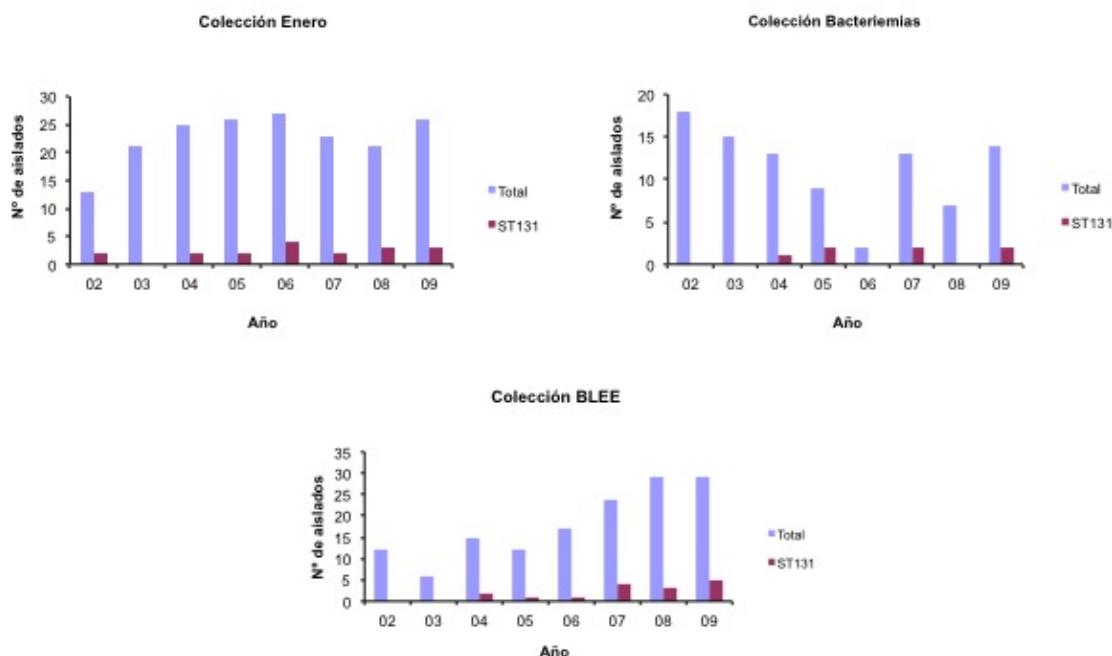
transcurso de los años. Al inicio del estudio el número de aislados ST131 es de 2 (4%), mientras que al final del período de estudio, año 2009, llegaron a contabilizarse 10 (14,5%) aislados ST131.



**Figura 26.** A) Distribución temporal del total de aislados de *E. coli*. B) Distribución temporal de los aislados ST131.

#### 4.2.4.1.4. Prevalencia de aislados ST131 según colección y año de aislamiento

En la figura 27 podemos observar que aquella colección en la que se detectaron por primera vez aislados ST131 fue en la de Enero, en el año 2002. En los años sucesivos hubo aislamientos, excepto en el 2003. En la colección de Bacteriemias el primer aislado se identificó en 2004 y a partir del año 2005 se detectaron en los años alternos. En la colección BLEE el primer año de aislamiento fue en 2006 y, a partir de entonces, hubo aislamientos todos los años.



**Figura 27.** Distribución temporal de los aislados ST131 de las colecciones Enero, Bacteriemias y BLEE.

#### 4.2.4.2. Filogrupos

##### 4.2.4.2.1. Distribución de filogrupos de todos los aislados ST131

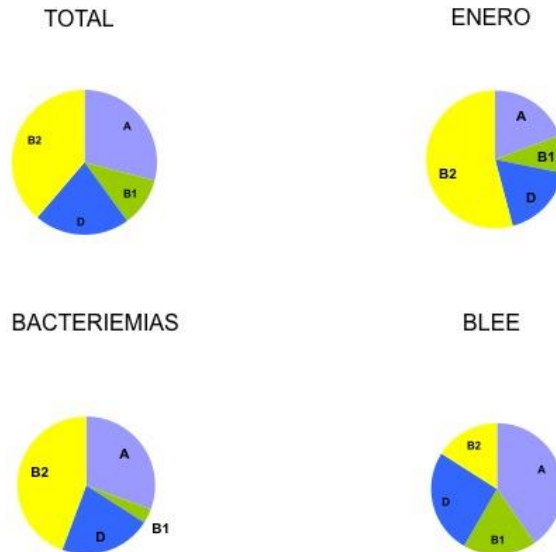
Respecto a la distribución de los filogrupos de todos los aislados analizados, observamos en la figura 28 que el grupo predominante fue B2 (38,8%), seguido de A (28,6%), D (21,3%) y, en último lugar, B1 (10,4%).

##### 4.2.4.2.2. Distribución de filogrupos según colección

Al tener en cuenta las colecciones de forma independiente, se puede distinguir en la figura 28 que el filogrupo predominante fue el B2 (53,8% y 42,9%) en el caso de las colecciones Enero y Bacteriemias, seguido de A (19,2% y 29,7%), D (17,6% y 20,9%) y B1

---

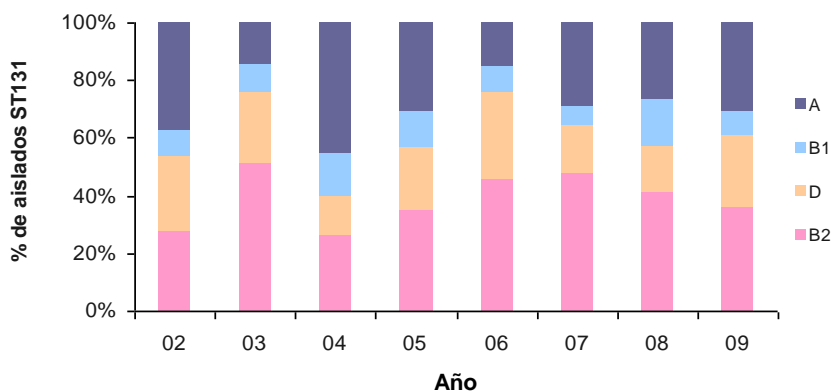
(8,8% y 3,3%), si bien en el caso de la colección BLEE el más frecuente fue el A (40,3%), seguido de D (25,7%), B1 (18,1%) y B2 (16%).



**Figura 28.** Distribución de filogrupos: distribución global, colección Enero, colección Bacteriemias y colección BLEE.

#### 4.2.4.2.3. Distribución de filogrupos según año de aislamiento

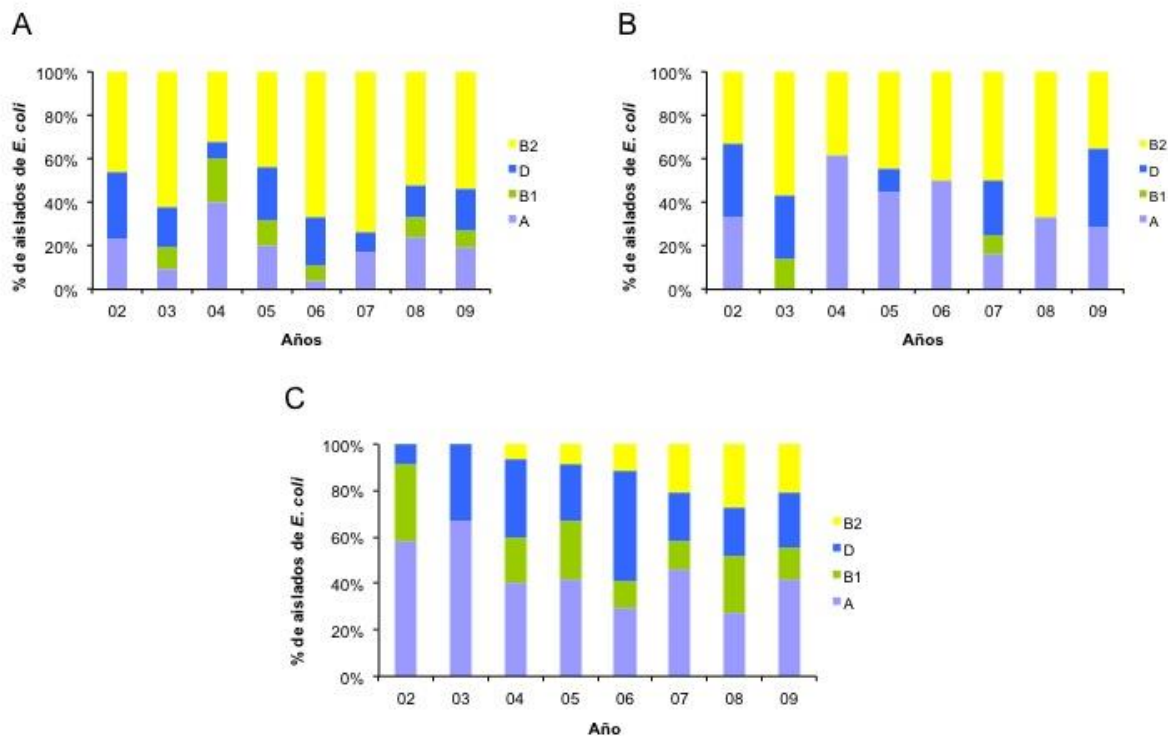
Como podemos ver en la figura 29 el filogrupo más frecuente en todos los años fue B2 (Media anual = 20%), exceptuando 2002 y 2004, años en los que se detectan con más frecuencia aislados del filogrupo A (Media = 20%), seguido de B2 (Media = 13%). En los años 2005, 2007-2009, el segundo grupo más prevalente fue A (Media = 16,8%), si bien en 2003 y 2006 fue D (Media = 6,5%).



**Figura 29.** Distribución temporal de filogrupos de todos los aislados de *E. coli*.

#### 4.2.4.2.4. Distribución de filogrupos según colección y año de aislamiento

Según la figura 30 el filogrupo B2 va aumentando de forma gradual su prevalencia a expensas del A. En la colección de Enero el filogrupo B2 es el más frecuente en casi todos los años, notándose un incremento gradual durante los años 2004-2007. En las colecciones de Bacteriemias y BLEE este aumento se produce desde el año 2004 hasta 2008.

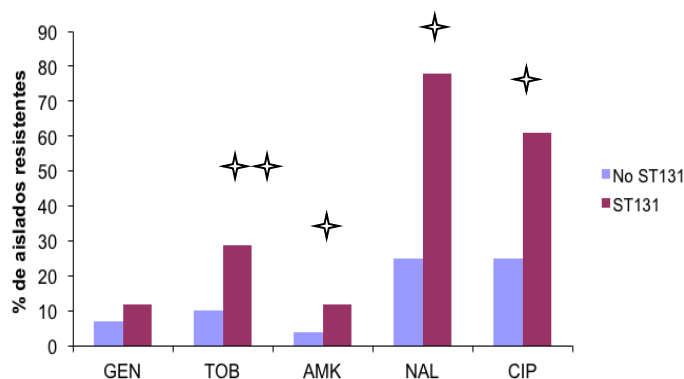


**Figura 30.** Distribución temporal de los filogrupos de los aislados de la colección de Enero (A), colección Bacteriemias (B) y colección BLEE (C).

#### 4.2.4.3. Sensibilidad a antimicrobianos

##### 4.2.4.3.1. Comparación de todos los aislados ST131 y no ST131

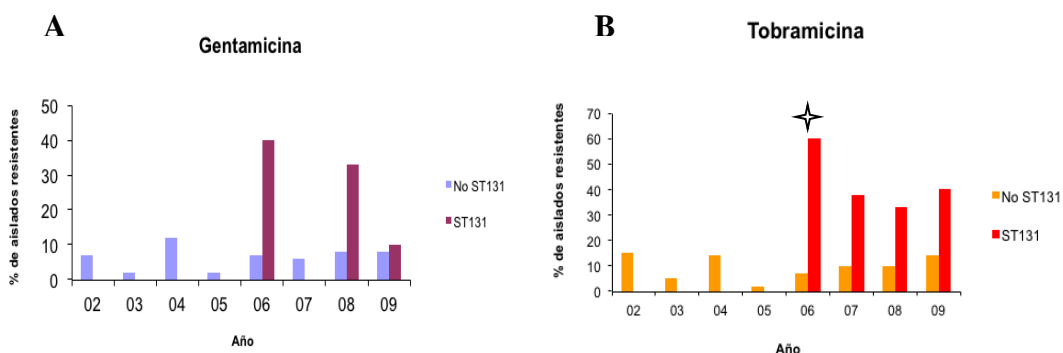
Teniendo en cuenta el total de aislados analizados durante los 8 años de estudio, podemos observar en la figura 31 que los aislados que pertenecían al clon ST131 fueron más resistentes de manera muy significativa a tobramicina (29% vs. 10%;  $p < 0,001$ ) y de forma significativa a amikacina (12% vs. 4%;  $p < 0,05$ ), ácido nalidíxico (78% vs. 25%;  $p < 0,05$ ) y ciprofloxacino (61% vs. 25%;  $p < 0,05$ ), que aquellos no ST131.

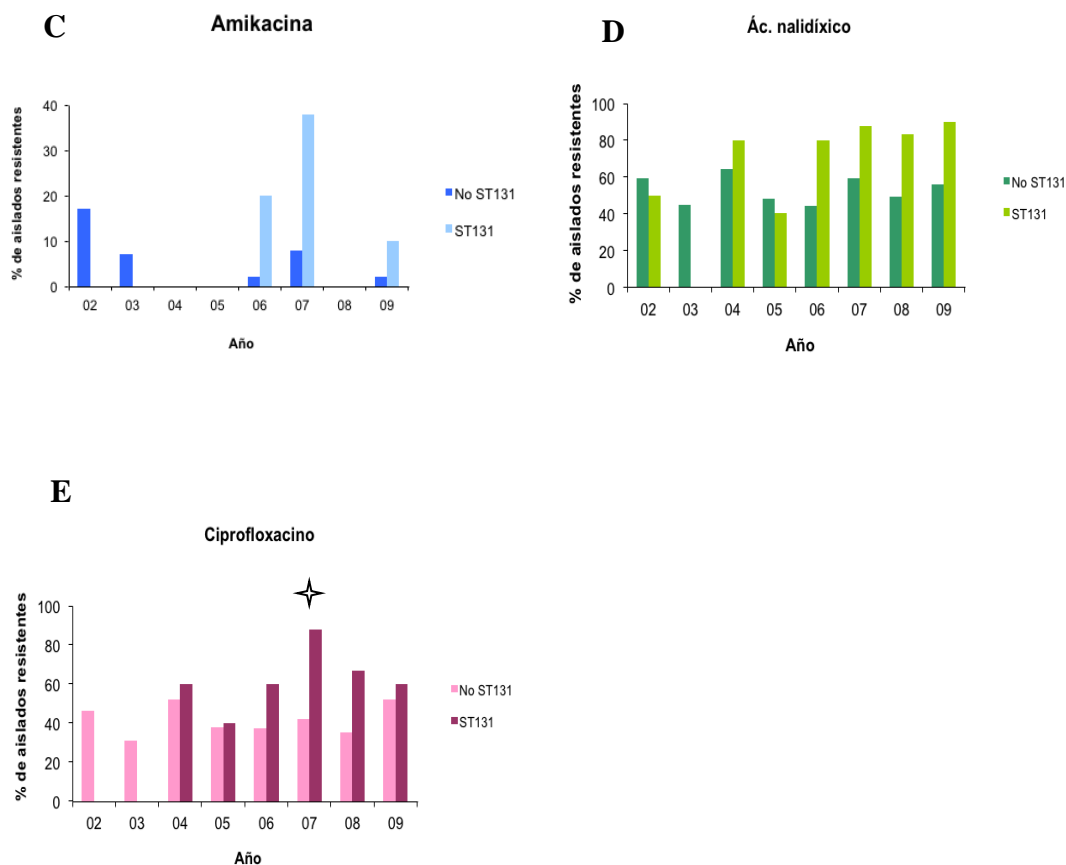


**Figura 31.** Distribución de la sensibilidad frente a diversos antibióticos de todos los aislados analizados durante el período 2002-2009. **GEN:** gentamicina; **TOB:** tobramicina; **AMK:** amikacina; **NAL:** ácido nalidíxico **CIP:** ciprofloxacino. ✨ ✨: Antimicrobianos para los que se hallaron diferencias muy significativas. ✨ : Antimicrobianos para los que se hallaron diferencias significativas.

#### 4.2.4.3.2. [Comparación de todos los aislados ST131 y no ST131 según año de aislamiento](#)

Los aislados ST131 detectados en los años 2006 fueron significativamente más resistentes a tobramicina (60% vs. 7%;  $p < 0,05$ ) y en el 2007 a ciprofloxacino, (88% vs. 42%;  $p < 0,05$ ), que los que no pertenecían al clon. Respecto a los otros años y demás antibióticos no hubo diferencias (figura 32).





**Figura 32.** Distribución de todos los aislados ST131 resistentes a Gentamicina (A), Tobramicina (B), Amikacina (C), Ácido nalidíxico (D) y Ciprofloxacino (E) en función del año de aislamiento.

\*: Antimicrobianos para los que se hallaron diferencias significativas.

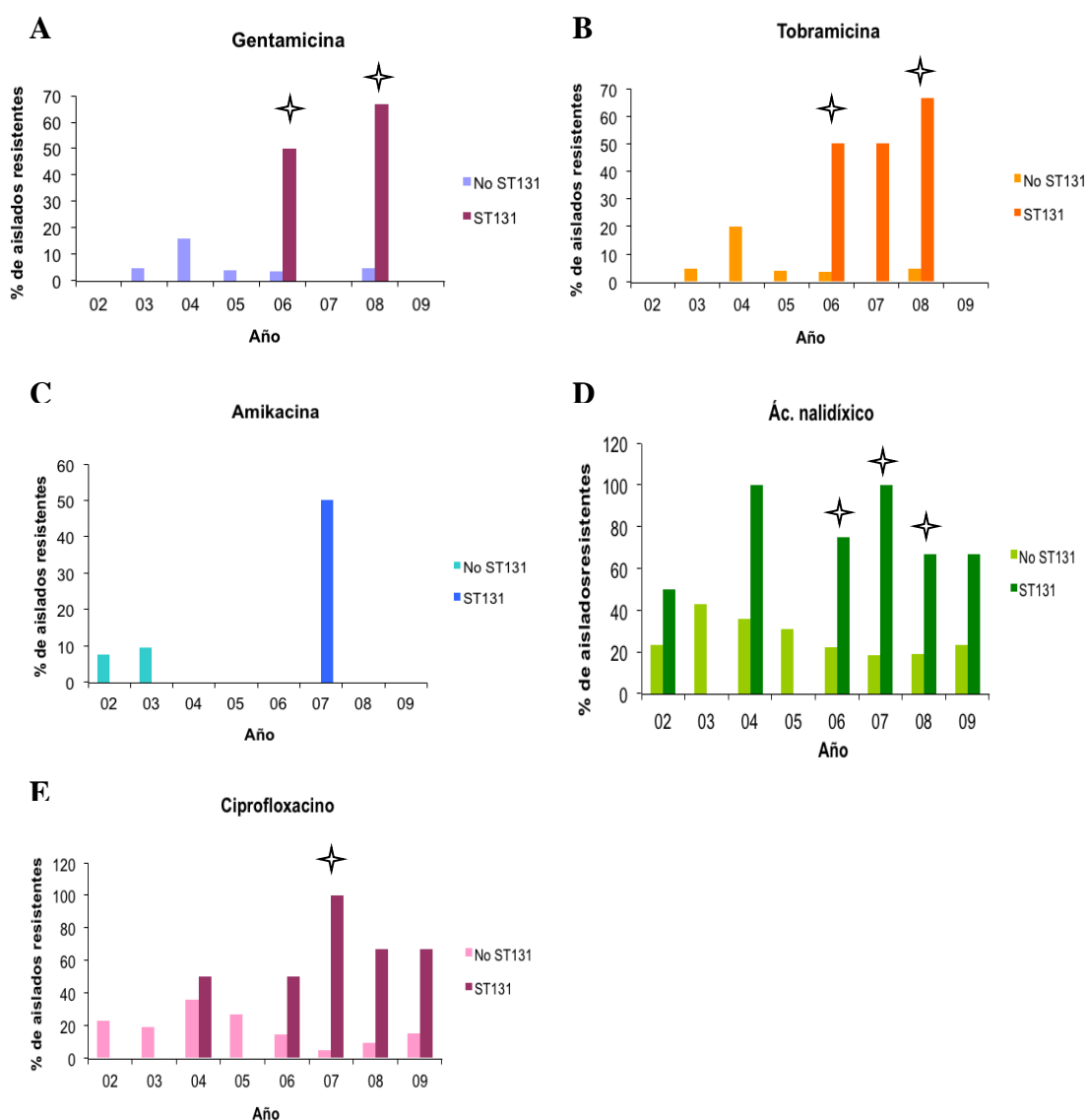
#### 4.2.4.3.3. Comparación de los aislados ST131 y no ST131 según colección y año de aislamiento

Aquellos aislados que pertenecían al clon ST131 de la colección de Enero fueron más resistentes a gentamicina y tobramicina durante los años 2006 y 2008 que los aislados no ST131 (50% vs. 4%;  $p < 0,05$ ) (figura 33). No hubo diferencias en cuanto a la amikacina. Durante los años 2006, 2007 y 2008, los aislados ST131 fueron más resistentes a ácido nalidíxico (75% vs. 22%; 100% vs. 18%; 67% vs. 19%;  $p < 0,05$ ) que los no ST131. En el año 2007 los aislados ST131 fueron también más resistentes a ciprofloxacino (100% vs. 5%;  $p < 0,05$ ), que los aislados no ST131.

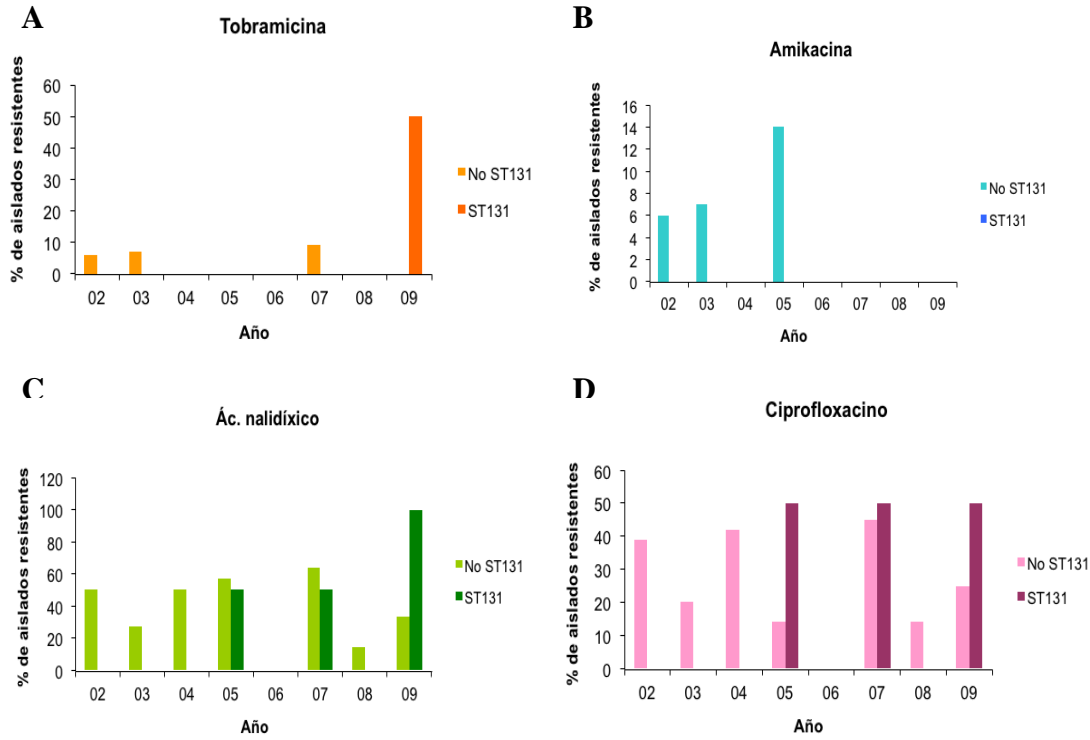


En la colección de Bacteriemias (figura 34) no se detectó ningún aislado resistente a gentamicina ni diferencias en los perfiles de sensibilidad entre los aislados ST131 y no ST131 durante todo el período de estudio.

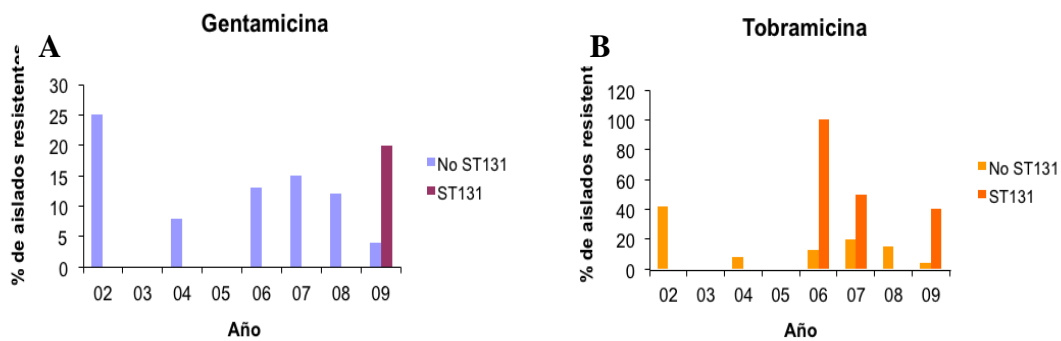
Los aislados de la colección BLEE pertenecientes al clon ST131 fueron más resistentes a tobramicina (100% vs. 13%;  $p < 0,05$ ) y amikacina (100% vs. 6%;  $p < 0,05$ ) durante el año 2006 y a gentamicina (20% vs. 4%;  $p < 0,05$ ) y tobramicina (40% vs. 4%;  $p < 0,05$ ) en el año 2009 (figura 35).

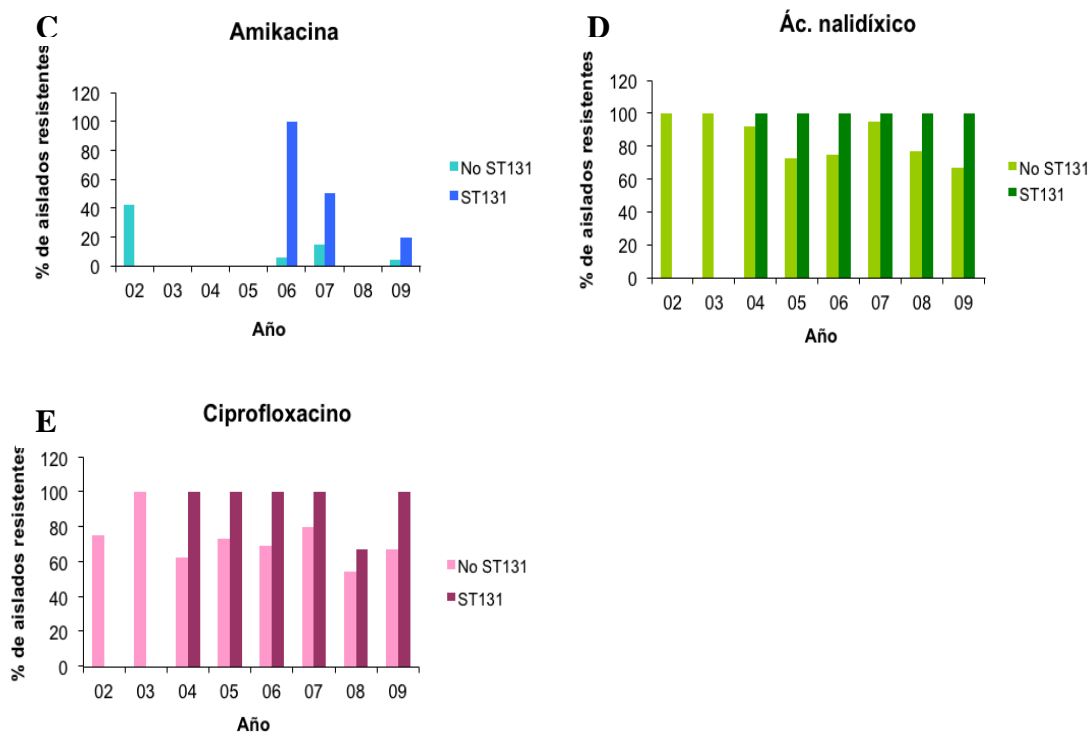


**Figura 33.** Distribución temporal de los aislados ST131 y no ST131 de la colección de Enero resistentes a Gentamicina (A), Tobramicina (B), Amikacina (C), Ác. Nalidíxico (D) y Ciprofloxacino (E). ✦: Antimicrobianos para los que se hallaron diferencias significativas.



**Figura 34.** Distribución temporal de los aislados ST131 y no ST131 de la colección de Bacteriemias resistentes a Tobramicina (A), Amikacina (B), Ác. Nalidíxico (C) y Ciprofloxacino (D).





**Figura 35.** Distribución temporal de los aislados ST131 y no ST131 de la colección BLEE resistentes a Gentamicina (A), Tobramicina (B), Amikacina (C), Ác. Nalidíxico (D) y Ciprofloxacino (E).✦. Antimicrobianos para los que se hallaron diferencias significativas.

#### 4.2.4.3.4. Aislados de ST131 productores de BLEE

Analizando de forma particular los aislados pertenecientes al clon ST131 y que adquieren genes codificantes de BLEE, el primer aislado ST131 productor de CTX-M-15 lo detectamos en el año 2006. En el año 2007 hubo 3 (25%) aislados ST131 productores de BLEE (CTX-M-15, CTX-M-32 y CTX-M-14); en el año 2008, dos (16,6%) aislados fueron productores de CTX-M-14 y en el 2009 fueron 5 (41,6%), 2 producían CTX-M-15 y 3 CTX-M-14.

#### 4.2.4.4. Estudio de clonalidad

Tras realizar PFGE a los 35 aislados ST131, los pulsotipos se distribuyeron según el número de aislado por pulsotipo, tal y como podemos ver en la tabla 35:

- 4 pulsotipos múltiples (11%), con más de un aislado por pulsotipo. Contenían 17 (48,5%) aislados.

2 pulsotipos (A, B) contaban con 6 aislados cada uno.

2 pulsotipos (C, D) contaban con 2 y 3 aislados, respectivamente.

- 18 pulsotipos únicos (89%), con un aislado por pulsotipo. Contenían el 51,5% de los aislados.

	Nº de pulsotipos	Nº de aislados
<b>Pulsotipos múltiples</b>	4	17
2-3 aislados	2	5
>3 aislados	2	12
<b>Pulsotipos únicos</b>	18	18

**Tabla 35.** Distribución de los aislados por pulsotipo.

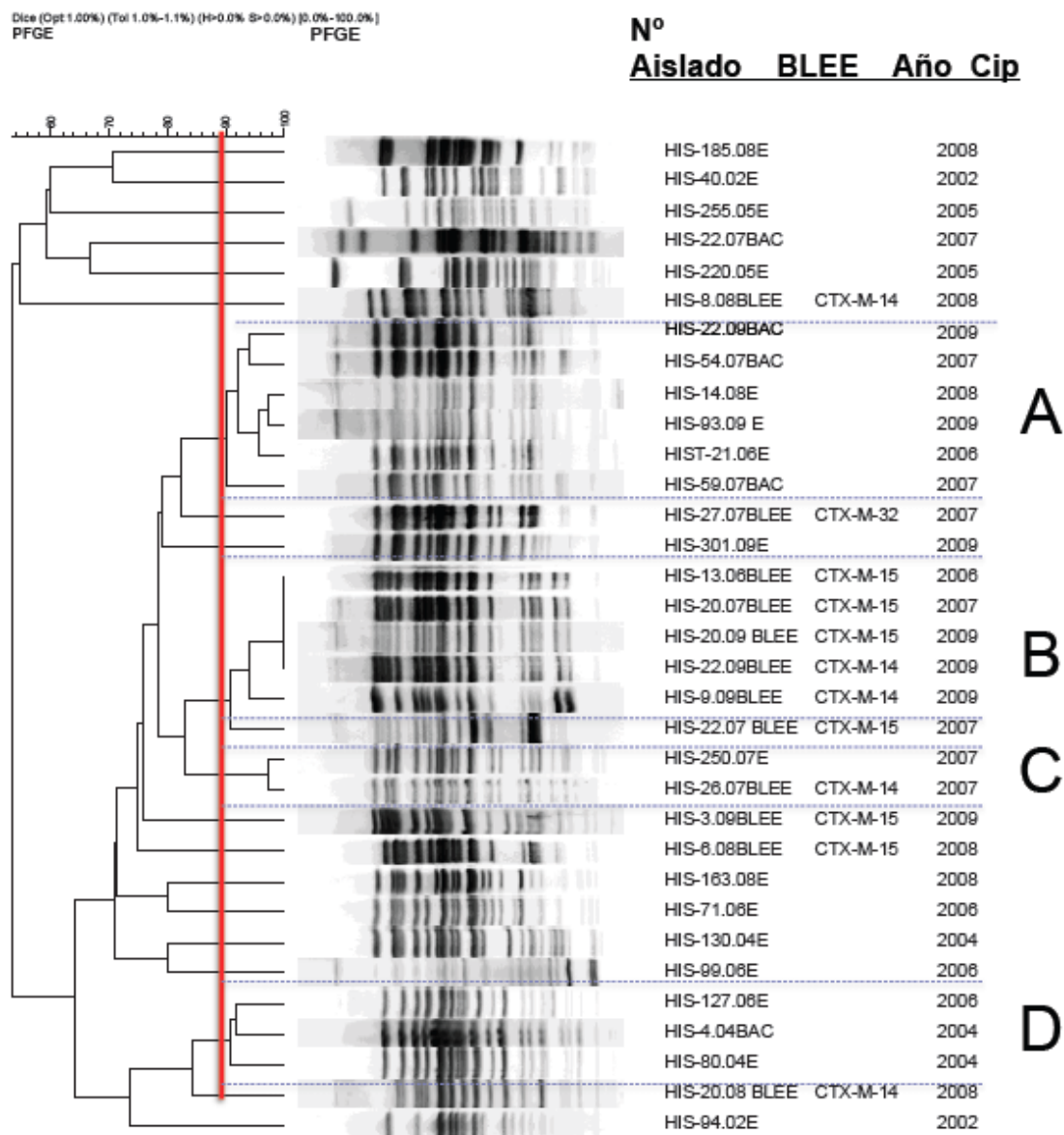
Se obtuvieron 4 clusters con 22 pulsotipos con un índice de similitud del 90%, tal y como se puede observar en el dendograma (Figura 36).

Cabe destacar que en la **zona central** del dendograma se puede apreciar el agrupamiento de 8 aislados, todos FQR y en su mayoría productores de BLEE, en torno a 2 pulsotipos:

- Pulsotipo B: engloba a 6 aislados productores de BLEE y FQR. Cuatro de los aislados producían CTX-M-15 y dos CTX-M-14. Un aislado es del año 2006, 2 del 2007 y 3 del 2009.
- Pulsotipo C: contiene 2 aislados, ambos FQR, uno productor de BLEE y otro no. Ambos aislados son del año 2007.

En la **zona superior** del dendograma se puede distinguir un pulsotipo (A) con 6 aislados (3 de la colección de Bacteriemias y 3 de Enero): todos son no productores de BLEE, mientras que 4 son FQS y 2 FQR. Un aislado es del año 2006, dos del 2007, uno de 2008 y dos de 2009.

En la **zona inferior** del dendograma se puede ver 1 pulsotipo (D) que engloba a 3 aislados (2 de la colección de Enero y 1 de Bacteriemias), todos sensibles a FQ y no productores de BLEE. Dos de los aislados son del año 2004 y uno del 2006.



**Figura 36.** Dendograma obtenido tras realizar PFGE con *Xba*I de aislados ST131. Los aislados que presentaron el mismo pulsotipo (< 3 bandas de diferencia e índice de semejanza > 94%, señalado por línea roja) se corresponden con las líneas discontinuas.



## 5. Discusión





En el estudio de prevalencia que hemos realizado, observamos por primera vez que el clon ST131 era un clon prevalente en nuestra área sanitaria entre todos los aislados de *E. coli*, no sólo entre los multirresistentes o resistentes a FQ. Los aislados de este clon fueron mayoritariamente de origen comunitario y relacionados principalmente con infecciones del tracto urinario. De todos los aislados ST131, sólo una minoría era productor de BLEE, principalmente CTX-M-15, en proporción similar al resto de aislados de *E. coli*. Respecto a la resistencia a antimicrobianos, tanto los aislados ST131 productores como no productores de BLEE, fueron más resistentes que los aislados que no pertenecían al clon. Entre todas las resistencias antimicrobianas detectadas destacó la relación entre los aislados ST131 productores de BLEE y la resistencia a FQ.

Hemos encontrado cierta homogeneidad a nivel de pulsotipo, siendo un pequeño número de pulsotipos múltiples los responsables de la diseminación del clon. También observamos que, a pesar de haber encontrado coincidencia con pulsotipos internacionales, la expansión del clon se debía principalmente a pulsotipos locales.

Todos los aislados del clon productores de BLEE y la mayoría de los no productores contenían al menos un plásmido IncF. En el caso de aislados ST131 productores de BLEE la mayoría de los plásmidos presentaba los replicones FII+FIA, mientras que en los plásmidos de aislados no productores era FII+FIB. Sin embargo, encontramos más homogeneidad en cuanto al subtipado plasmídico y perfiles de restricción entre los aislados ST131 productores de BLEE que entre los no productores.

Los plásmidos de aislados ST131 productores de BLEE presentaban con más frecuencia otros determinantes de resistencia, tales como *aac(6')-Ib-cr* y *bla<sub>OXA-1</sub>*, mientras que en los no productores de BLEE fueron más prevalentes los factores de virulencia. En cuanto a los sistemas de adicción, la mayoría de los plásmidos portadores de genes *bla* con la fórmula F2:A1:B<sup>-</sup> contenía la misma combinación de 5 sistemas de adicción (*pemKI*, *ccdAB*, *parDE*, *vagCD*, *hok-sok*).

---

En nuestra área la transmisión humano-animal de compañía no interviene en la diseminación del clon, ya que excepto una pareja de aislados, no encontramos coincidencias entre los pulsotipos. Cabe destacar que los aislados de individuos fueron más resistentes y producían BLEE con más frecuencia que los procedentes de animales de compañía.

La prevalencia del clon ST131 obtenida en el año 2010 fue del 12,5%, cifra similar a dos estudios realizados en años anteriores (tabla 36). Uno de ellos fue llevado a cabo por Blanco y cols. en el año 2009, quienes tras estudiar 500 aislados de *E. coli* procedentes de 5 hospitales de España (entre ellos HUVM) obtuvieron una prevalencia del clon ST131 del 12% (169). El otro estudio realizado en Reino Unido analizaron 300 aislados de *E. coli* de origen urinario correspondientes a los años 2007 y 2009, de los cuales el 12% pertenecían al clon ST131 (216). Sin embargo, en EEUU el clon resultó ser más frecuente, tal y como describen los siguientes trabajos. En uno de ellos, Johnson y cols. analizaron una colección de 127 aislados de *E. coli* durante el año 2007, llegando a pertenecer al clon ST131 el 16,6% de los aislados (217). En el segundo estudio americano tras analizar 299 muestras en el año 2011, obtuvieron que el clon ST131 contaba con el 27% de los aislados (218). Dicho incremento podría deberse a la inclusión de todas las muestras tanto de pacientes hospitalizados como comunitarios o al tiempo transcurrido entre ambos estudios. En el estudio de Johnson se seleccionan los aislados según sean productores de BLEE y/o resistentes a quinolonas, lo que podría justificar que su prevalencia fuera superior a la nuestra. Sin embargo, no incluyeron los aislados de origen comunitario ni los urocultivos, por lo que puede ser que las diferencias geográficas sean la razón por la que las tasas de aislados de *E. coli* ST131 de los estudios americanos sean mayores que la nuestra.

Nuestro estudio de prevalencia es el más extenso hasta día de hoy y en el que se han incluido todos los aislados de *E. coli* procedentes de cualquier tipo de muestra, sin llevar a cabo ninguna selección por producción de BLEE o resistencia a FQ.

País	Año de estudio	Criterio de selección de aislados	Nº de aislados	% de <i>E. coli</i> ST131	Referencia
EEUU	2011	Ninguno. Se incluyeron todos.	299	27	(218)
EEUU	2007	Producción de BLEE y/o resistencia a FQ. Pacientes hospitalizados. Todas las muestras, excepto urocultivos.	127	16,6	(217)
España	2010	Ninguno. Se incluyeron todos.	4.308	12,5	Este estudio
Reino Unido	2007 y 2009	Aislados de <i>E. coli</i> de pacientes con ITU.	300	12,3	(216)
España	2009	Ninguno. Se incluyeron todos.	500	12	(169)

**Tabla 36.** Prevalencia de aislados de *E. coli* ST131 respecto al total de aislados.

Respecto al origen de las muestras, obtuvimos que el 80,6% de los aislados de *E. coli* ST131 eran de origen comunitario y el 17,2% de origen nosocomial. Estos resultados son similares a los del estudio de Blanco y cols., quienes encontraron que el 73% de los aislados de *E. coli* ST131 eran comunitarios y el 27% nosocomiales (169). Cabe mencionar que ha sido difícil comparar nuestros resultados con otros estudios por la diferencia en cuanto a la definición de comunitario y nosocomial. Gibreel y cols. definieron como aislados nosocomiales los que procedían de pacientes hospitalarios, y los de origen comunitario los de atención primaria y medicina general, hallando un 48% y 52%, respectivamente (216). En el trabajo de Banerjee y cols. los pacientes relacionados con cuidados sanitarios se incluyeron dentro de los nosocomiales, de modo que obtuvieron que el 34% de los aislados ST131 fueron comunitarios y el 66% nosocomiales (218).

En cuanto al tipo de muestra, la mayoría de los aislados de *E. coli* (86,6%) era de origen urinario. De éstos, el 12,3% tenía un aislamiento de *E. coli* ST131. Nuestro resultado es inferior al obtenido a nivel europeo por Cagnacci, en el que el 23% de los aislados de *E. coli* causantes de infección del tracto urinario eran ST131 (164). Esta diferencia puede deberse a que en el estudio de Cagnacci se seleccionaron aquellos aislados de *E. coli* de origen comunitario y resistentes a ciprofloxacino. De hecho, si hubiéramos seleccionado nuestros aislados según los mismos criterios que en el estudio mencionado, habríamos obtenido un porcentaje similar al europeo (24% vs. 23%).

Nuestros datos revelan que la mayoría de los aislados del clon ST131 no eran productores de BLEE. Encontramos que la tasa de los aislados ST131 productores de

---

BLEE (7%) fue inferior a la de otros estudios y similar a la de los aislados productores de BLEE no pertenecientes al clon. Johnson y cols., tras analizar una colección de 579 aislados de *E. coli* ST131, encontraron que el 47% eran productores de BLEE (154). En otro estudio español hallaron una tasa de aislados ST131 productores de BLEE del 10% (169). Por otra parte, nuestra tasa de aislados de *E. coli* ST131 productores de BLEE fue igual a la de los aislados productores de BLEE no pertenecientes al clon (7%), por lo que el clon ST131 productor de BLEE es el prevalente en nuestra área.

La prevalencia de ST131 entre todos los aislados de BLEE es variable según la zona geográfica. En nuestro estudio el clon ST131 suponía el 12,5% de los aislados productores de BLEE, cifra muy inferior a la mayoría obtenida en estudios a nivel mundial, en los que el clon ST131 llega a suponer desde el 20% hasta el 81% de los aislados de *E. coli* productores de BLEE, tal y como se puede observar en la tabla 37. En España en un estudio multicéntrico del GEIH-BLEE-2006 el clon ST131 representaba el 19% de los aislados de *E. coli* BLEE (219). Respecto al Norte de América, en varios estudios canadienses ST131 supone desde un 31% hasta un 46% (35,194,195), mientras que en EEUU (Chicago) asciende hasta un 53% (222). En la India, República de África Central y Reino Unido el clon ST131 alberga desde la mitad hasta un 81% de los aislados de *E. coli* BLEE (35,159,166,212). En Europa y Asia, según varios estudios realizados en Lugo, Francia, Noruega, Taiwan, Camboya y Japón las tasas se encuentran en torno al 20-30% (35,165,167,194,223,192). Por otra parte, cabe señalar que también se han registrado tasas inferiores a la nuestra e incluso aislados ST31 no productores de BLEE en Filipinas, Tailandia, Francia y Madrid (35,193,224,225).

En todos los estudios, salvo en los de Blanco y el nuestro, se seleccionan los aislados en función de la producción de BLEE. Esto podría ser una de las razones por las que la prevalencia en la mayoría de los países la prevalencia es mayor que en el nuestro. Otras explicaciones de estas diferencias pueden ser la selección de aislados no solo productores de BLEE, sino además de CTX-M, como en el caso de Reino Unido; el haber visitado una zona de alto riesgo de adquisición de una infección por aislado productor de BLEE, como la India; seleccionar las muestras solo de urocultivos de la comunidad, como Camboya y Francia o bacteriemias, como en Canadá, Países Bajos y Taiwan. Y en lo que respecta a las prevalencias de nuestro país, puede ser que la hallada en Lugo sea superior a la nuestra porque gran parte de los aislados procedían de residencias, el cual

puede ser un reservorio del clon (194); la de Madrid puede que fuera inferior por haberse realizado el estudio 6 años antes que el nuestro.

Zona geográfica	Año	Origen	Nº de <i>E. coli</i> BLEE	% de ST131	Referencia
UK	04-07	Colección laboratorio	103	81	(35)
UK	03-04	Muestra clínicas	287	65	(166,212)
India		Infecciones asociadas a viajes	31	61	(221)
Chicago	08	Muestras clínicas comunitarias	30	53	(222)
Rep. África Central	04-06	Colección laboratorio	10	50	(35)
Canadá	07	Muestra clínicas	209	46	(162)
Canadá	04-06	Colección laboratorio	41	41	(35)
Países bajos	08-09	Bacteriemias	41	34	(194)
Calgary	00-07	Bacteriemias	67	31	(221)
Pittsburgh	07-08	Muestra clínicas	70	30	(160)
Taiwan	05-10	Bacteriemias	122	29	(223)
Camboya	04-05	ITUs comunitarias	30	27	(35)
Lugo	06-07	Mayoría ITU	105	22	(194)
Lugo	07-08	Mayoría ITU	249	22	(194)
Francia	06	ITU comunitaria	48	21	(194)
Multinacional	04-06	Viajeros de retorno	84	19	(159)
Japón	02-03	Colección laboratorio	142	19	(167)
Sevilla	2010	Muestra clínicas	292	12,5	Presente estudio
Madrid	04	ITU	91	9	(224)
Brasil	08-09	Muestra clínicas	25	8	(226)
Filipinas	07	Muestra clínicas	15	7	(225)
Tailandia	1999	Colección laboratorio	5	0	(35)
Francia	06	Voluntarios sanos	100	0	(193)

**Tabla 37.** Distribución geográfica de aislados de *E. coli* ST131 productores de BLEE.

Originariamente, como ya hemos comentado previamente en otras secciones, los aislados de ST131 se describieron entre aislados de *E. coli* productores de CTX-M-15. De todos los aislados de *E. coli* productores de CTX-M-15 procedentes de 8 países y 3

continentes, el 88% eran aislados del clon ST131 (152). En la tabla 38 podemos observar los diferentes estudios en los que se detalla la distribución de los aislados ST131 productores de CTX-M-15. En nuestro estudio, obtuvimos una tasa del 70%, similar a la de un estudio belga e inferior a la de un estudio nacional multicéntrico, ambos del año 2006, en los que el 72% y el 86% de los aislados productores de CTX-M-15 eran ST131 (177,227). Por otra parte, en otro estudio multinacional el clon ST131 contaba con menos de la mitad de los aislados productores de CTX-M-15 (67), lo cual puede deberse a que los aislados procedían sólo de muestras de pacientes hospitalizados, mientras que en los otros estudios se incluyeron tanto los comunitarios como los nosocomiales.

Zona geográfica	Año	Origen	Nº <i>E. coli</i> CTX-M-15	% ST131	Referencia
Europa, Asia y Canadá	NE	Muestras clínicas y de laboratorio	41	88	(152)
España	06	Muestras clínicas	37	86	(227)
Sevilla	10	Muestras clínicas	50	70	Presente estudio
Bélgica	06-07	Muestras clínicas	43	72	(177)
Europa, Canadá y Oriente Medio	00-06	Colección laboratorio	43	42	(67)

**Tabla 38.** Distribución geográfica de aislados de *E. coli* ST131 productores de CTX-M-15. NE: no especificado.

Del total de nuestros aislados ST131 productores de BLEE, la enzima más frecuente fue CTX-M-15 (92,1%). Únicamente dos aislados (5,3%) producían CTX-M-32 y uno (2,7%) CTX-M-14. Johnson encontró con más frecuencia aislados de ST131 productores de BLEE (47%) entre los aislados de la colección de referencia. Sin embargo, eran menos los aislados que producían CTX-M-15 (69%) (154). Nuestros resultados son similares a los de Blanco y col, quienes hallaron que el 96% de los aislados ST131 producía CTX-M-15 y el 4% CTX-M-14 (194), y a los de otros estudios de diferentes orígenes. Así, en Canadá durante los años 2000-2010 el 80% de los aislados ST131 producía CTX-M-15 y el 17% CTX-M-14 (228). En Francia y Portugal la prevalencia de CTX-M-15 en aislados ST131 se situaba por encima del 90% (229–231). Mientras que en el caso de Rumanía, la India y la República Central Africana era del 100% (232–234).

---

Una situación diferente ocurre en otras zonas donde CTX-M-14 se describe con más frecuencia e incluso llega a ser la predominante entre aislados de ST131. De modo que, en Australia y Nueva Zelanda, donde predominan los aislados ST131 productores de CTX-M-15 (60%), también son muy frecuentes los que producen CTX-M-14 (38%) y algunas coproducen ambas enzimas (235). En Japón, Camboya, Hong-Kong y en 11 provincias de 7 regiones de China la enzima más prevalente entre los aislados ST131 es CTX-M-14, contando con 47%, 61%, 73% y 67%, respectivamente (168,236–238).

Si comparamos los resultados de los estudios comentados con anterioridad, podemos distinguir que en países de Occidente (EE.UU., Canadá y Europa) se ha expandido el clon ST131 productor de CTX-M-15, mientras que en países de Oriente lo ha hecho el clon productor de otra BLEE diferente a CTX-M-15. Esto puede sugerir que el clon se ha expandido y posteriormente ha adquirido los genes *bla* mediante transferencia horizontal (167) o bien que se ha producido la adquisición de los genes *bla* según la zona, lo cual ha contribuido a su diseminación.

En nuestro estudio destaca la asociación, tanto en productores como no productores de BLEE, entre ST131 y la resistencia a amoxicilina-clavulánico, aminoglucósidos y ciprofloxacino. Hay una diferencia en cuanto a la resistencia a aminoglucósidos, según si producían o no de BLEE. En el caso de los aislados productores de BLEE, los ST131 son más resistentes a amikacina y tobramicina que los no ST131, mientras que entre los aislados no productores de BLEE hay mayor resistencia a los tres aminoglucósidos testados. Nuestros resultados coinciden con los de un estudio francés (239) y otro canadiense (221) en cuanto a la resistencia de todos los aislados ST131 a ciprofloxacino (tabla 39). Sin embargo, tal y como se puede observar en la tabla 40, hay diferencias con los aislados productores de BLEE, ya que en el caso de los aislados ST131 franceses eran más resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol y piperacilina-tazobactam y los canadienses a gentamicina y piperacilina-tazobactam que los no ST131.

La resistencia a AMC puede deberse a la adquisición de OXA-1 o IRT, tal y como describen Oteo y cols. en un estudio multicéntrico en el que analizan una serie de aislados de *E.coli* resistentes a amoxicilina-clavulánico, resultando el clon ST131 el segundo clon más frecuente entre los aislados productores de OXA-1 y el más frecuente entre los productores de IRT (240). En nuestra área se ha detectado durante los años 2011 y 2012 un aumento de aislados productores de OXA-1 recogidos con sensibilidad disminuida a

amoxicilina-clavulánico debido a la diseminación de los clones ST88 y ST131, incluyéndose en este último tanto aislados productores como no productores de BLEE (241). Aunque también la resistencia a AMC también puede deberse a la adquisición de TEM-1 o a la hiperproducción de AmpC.

En lo que respecta a la resistencia de los aislados de Lisboa en comparación con los nuestros, cabe mencionar que los portugueses eran más productores de BLEE y más resistentes a amoxicilina-clavulánico, gentamicina, tobramicina, trimetoprim-sulfametoxazol y fosfomicina que los nuestros.

Referencia	Aislados productores de BLEE								
	Presente estudio			Brisse, JCM 2012			Pitout, AAC 2009		
	% de resistencia			% de resistencia			% de resistencia		
<b>Antimicrobiano</b>	No ST131	ST131	p	No ST131	ST131	p	No ST131	ST131	p
Amoxicilina-clavulánico	28,6	82,4	<0,001	89	93				
Piperacilina-tazobactam	6,2	16,7	0,055	44	67	0,015	30	81	0,0002
Gentamicina	21,5	3,3	0,014	38	31		48	86	0,004
Tobramicina	19,9	80	<0,001				63	86	0,09
Amikacina	1,3	28	<0,001	15	34	0,01			
A. nalidíxico	94,4	100	0,377	68	96	<0,001			
Ciprofloxacino	81,5	97,1	<b>0,024</b>	57	94	<b>&lt;0,001</b>	85	100	<b>0,004</b>
Trimetoprim-sulfametoxazol	49,4	64,7	0,094	77	43	<0,001	65	67	1
Fosfomicina	3,3	3,3	1	0	0				

Tabla 39. Sensibilidad de los aislados ST131 y no ST131 productores de BLEE.



Antimicrobiano	Aislados NO productores de BLEE					
	Presente estudio			Brise, JCM 2012		
	% de resistencia			% de resistencia		
	No ST131	ST131	p	No ST131	ST131	p
Amoxicilina-clavulánico	18	27,6	<0,001	22	33	
Piperacilina-tazobactam	4,9	5,5	0,643	10	10	
Gentamicina	7,7	17	<0,001	4	20	0,03
Tobramicina	7,9	20,2	<0,001			
Amikacina	0,1	1,2	<0,001	1	0	
A. nalidíxico	40,9	76,1	<0,001	24	73	<0,001
Ciprofloxacino	32,6	72,8	<0,001	13	67	<0,001
Trimetoprim-sulfametoxazol	30,3	33,1	0,165	34	29	
Fosfomicina	1,1	1,1	0,996	1	14	

Tabla 40. Sensibilidad de los aislados ST131 y no ST131 no productores de BLEE.

Además de la resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido por la producción de BLEE, la resistencia a FQ es otro rasgo común de los primeros aislados descritos del clon ST131 (67,152). En nuestro estudio encontramos una asociación entre los aislados ST131 tanto productores como no productores de BLEE con la resistencia a FQ, obteniendo que el 97,1% y 72,8% de los aislados, respectivamente, fueron resistentes a FQ.

Respecto al total de aislados de *E. coli* productores de BLEE y resistentes a FQ, nosotros obtuvimos que el 13,4% correspondía al clon ST131, lo cual es similar a lo que sucede en China, según un trabajo correspondiente a los años 1998-2000 (179). Sin embargo, es muy inferior a lo hallado en otros estudios, en los que desde un 30% hasta un 60% de los aislados de *E. coli* BLEE y resistentes a FQ pertenecían al clon ST131. Como podemos observar en la tabla 41, Cerquetti encontró en Roma en el año 2006 que el 61% de los aislados de bacteriemias e infecciones del tracto urinario con *E. coli* resistentes a FQ y BLEE eran ST131 (178). En otras zonas de Asia, Canadá y Australia, la prevalencia de ST131 entre aislados BLEE y resistentes a FQ estaba en torno al 25%-35% (179,221,242,243). Puede ser que la tasa tan elevada de Cerquetti se deba a que la

mayoría de los aislados que vehiculizaban genes *bla* producían CTX-M-15. En el resto de estudios puede ser que las tasas sean superiores a la nuestra porque hay una selección de aislados por origen (bacteriemia o urocultivo). Una de las razones que pueden explicar este fenómeno es que existan otros clones resistentes a FQ, tales como O15:K52:H1-ST393 y CGA-ST69 (164,194) y que, a pesar de ser ST131 un clon prevalente, no haya llegado a desplazarlos.

País/región	Año	Características del estudio	Nº <i>E. coli</i> BLEE		Referencia
			FQR	% ST131	
Italia (Roma)	2006	Bacteriemias e ITU	18	61	(178)
Australia (Queensland)	2007-08	ITU	582	35	(243)
Korea	2005	Colección laboratorio	21	>33	(179)
Japón	2003-07	Muestras clínicas	128	>30	(179)
Korea	2006-07	ITU comunitarias	129	25	(242)
Reino Unido	2001-05	Bacteriemias: FQR no BLEE + <i>aac(6')</i>	10	50	(244)
Canadá	2000-07	ITU	199	23	(221)
China	1998-00	Colección laboratorio	12	>17	(179)
España (Sevilla)	2010	Muestras clínicas	218	15	Nuestro estudio

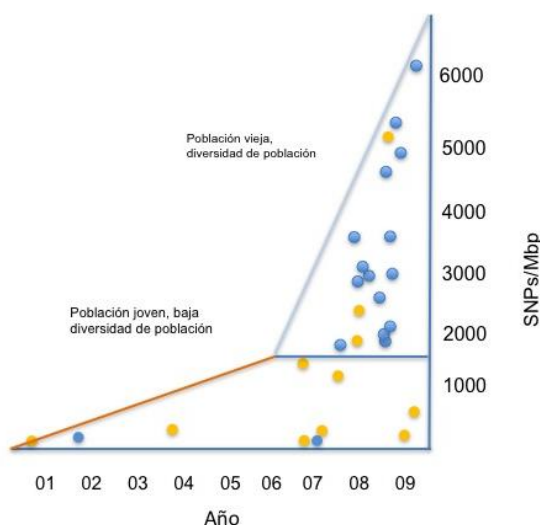
**Tabla 41.** Prevalencia de aislados de *E. coli* ST131 entre aislados FQR.

Sin embargo, aun suponiendo un 13,4% de todos los resistentes a FQ, hemos hallado una tasa elevada (72,8%) de aislados ST131 resistentes a FQ no productores de BLEE, lo cual también se ha descrito en otros países. En Reino Unido, de todas las bacteriemias con aislados de *E. coli* resistentes a FQ no productores de BLEE, el 50% pertenecieron al clon ST131 (244). Por otro lado, en EE.UU. y Canadá, Johnson y cols. estudiaron una serie de aislados procedentes de muestras de urocultivos, de los cuales el 23,1% de los aislados de *E. coli* resistentes a FQ fueron ST131 y solo un 2% de estos

eran productores de BLEE (153). Esto sugiere que ST131 era inicialmente resistente a FQ y luego adquirió los plásmidos que vehiculizaban los genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Lo veremos más adelante al analizar los linajes dentro de este clon.

Tras realizar el estudio de relación genética mediante PFGE, encontramos variabilidad a nivel de pulsotipo dentro del clon, aunque observamos que la diseminación del clon en parte se debía a un pequeño número de pulsotipos múltiples (13 pulsotipos de un total de 50 pulsotipos), los cuales contenían más de la mitad de los aislados. Johnson y cols. analizaron los pulsotipos de 579 aislados, obteniendo menos dispersión que en nuestro trabajo, ya que los pulsotipos múltiples (65 pulsotipos de un total de 170 pulsotipos) incluían más población (82%) de *E. coli* ST131 que en nuestro estudio, mientras que los pulsotipos únicos suponían el 18% de los aislados (154).

Tanto en nuestro estudio local como en el internacional llevado a cabo por Johnson y cols., la homogeneidad que se encontró a nivel de pulsotipo indica que al menos una parte del clon se ha expandido recientemente. Según Shapiro y cols., quienes estudiaron la relación de las variaciones genéticas medidas en SNPs de 30 poblaciones bacterianas procedentes de un lago durante un período de 9 años, encontraron que las poblaciones viejas tenían mayor variación, mientras que las más recientes eran más homogéneas (245). En la figura 40 mostramos una adaptación de este concepto.



**Figura 36.** Diversidad genética de las poblaciones de *E. coli* en función del tiempo y los SNPs totales (SNPs/Mbp). SNPs/Mbp: Single NucleotidePolymorphim/megabasepair.

---

Por otra parte, encontramos que, tanto en nuestra área como en Lisboa, había una pequeña expansión de linajes internacionales. En la comparación de los aislados de Sevilla y Lisboa detectamos que el 6% tenía relación con aislados internacionales: tres pulsotipos de Sevilla y uno de Lisboa coincidían con el pulsotipo internacional 968. Además, hubo otros dos pulsotipos de Sevilla similares al internacional 800 y otro al 903. A pesar de haber detectado estas coincidencias, la mayoría de la población de Sevilla tenía pulsotipos diferentes a los de Lisboa y no coincidentes con los internacionales, lo que indica que la diseminación del clon en nuestra área se debe a pulsotipos mayoritariamente locales.

En cuanto a la relación entre los aislados productores de BLEE y resistentes a FQ, detectamos que tanto aislados ST131 sensibles como resistentes a FQ y/o productores de BLEE tenían pulsotipos similares. Encontramos que la mayoría de los aislados ST131 productores CTX-M-15 se agrupaban en torno a unos pocos pulsotipos, de los cuales uno tenía aislados con cierta homogeneidad respecto a la producción de CTX-M-15 y resistencia a FQ, mientras que el resto de pulsotipos eran compartidos por aislados resistentes a FQ y productores de CTX-M-15, y otros sensibles a FQ no productores de CTX-M-15. Al igual que nosotros, Johnson y cols. obtuvieron heterogeneidad en relación a la producción de BLEE dentro del mismo pulsotipo. Sin embargo, encontraron homogeneidad en cuanto al fenotipo de FQ, de modo que la mayoría de los pulsotipos que estudiaron, excepto uno, contenían aislados resistentes a FQ (154).

El hecho de que encontráramos pulsotipos que incluyeran tanto aislados sensibles como resistentes a FQ y/o productores de CTX-M-15 sugiere que en nuestra área algunos sublinajes del clon han expandido sin adquirir la resistencia a quinolonas y que la adquisición de CTX-M-15 ha ocurrido varias veces y de forma horizontal durante el proceso de expansión. Esta teoría se contradice con la de Johnson y cols., quienes encontraron que los aislados productores de CTX-M-15 se agrupaban dentro sublinajes específicos, por lo que sugerían que dicha enzima se transmitía de manera vertical. Respecto a las FQ, encontraron que los aislados resistentes tenían los mismos SNPs en *gyrA* y *parC*, en comparación con un aislado histórico sensible a FQ en el que estaban ausentes. De ahí, que defiendan que los aislados resistentes derivan de un ancestro común resistente a FQ y este, a su vez, de uno sensible tras adquirir las mutaciones; es decir, la adquisición de las mutaciones fue anterior a la expansión de los aislados resistentes a FQ (217).

---

Tras realizar el subtipado de *fimH* de una selección de aislados del clon ST131 tanto productores como no productores de BLEE, obtuvimos resultados parcialmente coincidentes con los de Johnson. Tanto nosotros como él encontramos 7 linajes de *fimH*, de los cuales *H30* y *H22* eran dos de los más frecuentes en ambos estudios. En nuestro estudio *H27* ocupaba el tercer lugar y en el de Johnson *H41*. Ninguno de nuestros aislados pertenecía a subclon *H41*.

Dentro de nuestro grupo de aislados productores de BLEE se diferenciaron 3 subclones, mientras que entre los no productores hubo mayor dispersión de los aislados. Los dos linajes más frecuentes fueron *H30* y *H22*, siendo *H30* significativamente más frecuente entre los aislados ST131 productores de BLEE.

En relación a la resistencia a FQ, la mayoría de los aislados del subclon *fimH30* era resistente a las mismas. Esto se correspondía con el 63% del total de aislados resistentes, por lo que podríamos decir que, aunque fue inferior a la tasa que halló Johnson con la colección de referencia, coincide con lo que sucede a nivel mundial en cuanto a la expansión de *H30* y la relación con la resistencia a ciprofloxacino.

Por otro lado, se agruparon dentro del subclon *H22* aislados principalmente no productores de BLEE tanto sensibles como resistentes a FQ en igualdad de proporción, a diferencia de los estudios de Johnson, en los que la mayoría de los aislados del linaje *H22* eran FQS.

Nosotros no hemos estudiado la relación entre los pulsotipos de aislados sensibles/resistentes a FQ y *fimH*, por lo que no podemos establecer cómo se producía diseminación del clon resistente a FQ. Pero Price y cols. sí estudiaron una serie de aislados ST131 correspondientes a los años 1967-2011 mediante PFGE y secuenciación de *fimH*, y encontraron que el subclon *H30* pertenecía a diferentes clusters independientemente de si los aislados eran resistentes o no al ciprofloxacino, o si producían o no CTX-M-15. Esto sugiere que tanto la adquisición de resistencia a FQ como la de los genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> ha ocurrido de manera horizontal durante un largo período de tiempo. Sin embargo, cuando quisieron hacer una reconstrucción filogenética basada en SNPs del genoma completo de los aislados anteriores, encontraron que los linajes *H30* y *H22* derivan del mismo ancestro y que los aislados *FimH30* resistentes a FQ productores de CTX-M-15 y no productores de CTX-M-15 que pertenecían a clusters diferentes según el análisis de los pulsotipos, se encontraban formando dos clusters, *H30-R* y *H30-Rx*. El

---

sublinaje *H30-R* incluía los aislados resistentes a FQ no productores de CTX-M-15, dentro del cual se encontraba el otro cluster *H30-Rx* con aislados resistentes a FQ y productores de CTX-M-15. Esto indica que la adquisición del alelo *fimH30* tuvo lugar antes de la adquisición de la resistencia a FQ por un único ancestro dentro del subclon *H30*, el cual fue el que expandió las cepas resistentes a FQ dentro del clon ST131 (183). Esta teoría también coincide con Banerjee y cols., quienes afirman que el clon ST131 *H30* comprende subclones y deriva del mismo ancestro sensible a FQ (182).

Por otro lado, utilizando también la técnica de secuenciación del genoma completo de aislados ST131, hay dos estudios que revelan que el linaje *H22* es el antecesor del linaje *H30*. Uno de ellos analiza una serie de aislados ST131 de múltiples zonas a nivel mundial y detecta que antes de la emergencia y diseminación del subclon *H30*, la población de ST131 consistía principalmente de dos linajes, *H22* y *H41*. La mayoría de la población sensible a FQ se incluía en el linaje *H22*, el cual tras la adquisición de mutaciones en *gyrA* y *parC* evolucionó y originó el sublinaje *H30* (246). También, utilizando secuenciación del genoma completo, Ben Zakour y cols. describieron que el sublinaje C, correspondiente a *H30*, ha tenido lugar como consecuencia de mutaciones y procesos de recombinación. De modo que identificaron 5 sublinajes dentro de *H22* que se originaron tras sucesivas inserciones y recombinaciones genéticas en los genes *flag-2*, *parC*, *GI-PheV* y *Phi3*. Otras inserciones en *GI-PheV*, eventos de recombinación y mutaciones en *gyrA* y *parC*, coincidiendo estas últimas con la introducción de las FQ, tuvieron lugar en el sublinaje B5, lo cual dio lugar a los linajes C y C1 y C2, correspondiéndose estos dos últimos con los sublinajes *H30-R* y *H30-Rx* (247).

Esta estructura clonal da lugar a una sucesión de resistencias antimicrobianas entre linajes asociados al linaje *H30*, desde los más sensibles a FQ hasta los resistentes y, finalmente, los resistentes a FQ y productores de CTX-M-15 (181).

En nuestro medio no encontramos que el reservorio animal jugara un papel significativo en la diseminación de ST131. Tras comparar los pulsotipos de individuos con los de mascotas, observamos que más de la mitad de los pulsotipos de aislados de individuos eran múltiples, lo cual implica mayor clonalidad. Sin embargo, la mayoría de los pulsotipos de mascotas eran únicos, es decir, encontramos más heterogeneidad del clon. Encontramos coincidencia entre un pulsotipo de origen humano y otro animal, pero no encontramos ninguna coincidencia con ningún pulsotipos internacionales. Esto nos sugiere que el clon ST131 se está diseminando entre los individuos, pero no en animales.

Sin embargo, en otros estudios sí encontraron pulsotipos comunes a humanos y mascotas, aunque se trata de estudios que analizan pequeños grupos de aislados. En Australia, tras estudiar la relación genética de 20 aislados de origen humano y 9 de origen animal resistentes a FQ, encontraron que un pulsotipo englobaba 12 aislados (41%), 6 de humanos y 6 de mascotas, el cual además coincidía con el pulsotipo internacional 968. Por otro lado, 3 pulsotipos (3%, cada uno) de mascotas se correspondían con otros pulsotipos de referencia internacionales (905,920,1153) (202). En un trabajo multicéntrico europeo estudiaron la relación genética de 10 aislados de *E. coli* ST131 productores de BLEE de procedencia animal, detectando que el 60% de los pulsotipos se agrupaba en el mismo cluster (203). Es de destacar que en este último estudio no se analizó la relación genética entre los aislados de animales y humanos, ni con los internacionales. Puede ser que en el estudio australiano encuentren mayor coincidencia a nivel de pulsotipos que en el nuestro porque sus aislados fueron seleccionados en función de la producción de FQ.

En cuanto a la resistencia a antimicrobianos encontramos que los aislados de individuos producían con más frecuencia BLEE y eran más resistentes a ciprofloxacino, tobramicina y trimetoprim-sulfametoxazol que los aislados de animales. Hay otros estudios que coinciden en la mayor tasa de producción de BLEE de los aislados humanos frente a los de mascotas. Por ejemplo, en la serie de aislados australianos anteriormente comentada, el 96% de los aislados ST131 productores de CTX-M-15 eran de origen humano, mientras que el 4% era de origen animal (perros y gatos). Sin embargo, en lo que concierne a la resistencia a otros antimicrobianos no se encontraron diferencias (202).

A pesar de haber encontrado aislados de ST131 en animales de compañía con características similares a los aislados de origen humano, tales como resistencia a FQ y plásmidos IncF que vehiculizan genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *qnr* y *aac(6')-Ib-cr* ((200,248), e incluso haber encontrado en la misma casa aislados de ST131 de perros y gatos con el mismo pulsotipo (201), el número de estudios que relacionen genéticamente aislados de origen humano con aislados de origen animal (mascotas) es muy reducido. Por ello, podemos concluir que actualmente hay poca evidencia de que las mascotas contribuyan a la diseminación del clon ST131.

Respecto a la caracterización plasmídica, obtuvimos que todos los aislados productores de BLEE y la mayoría de los aislados no productores de BLEE contenían al menos un plásmido del grupo de incompatibilidad IncF. Actualmente, son escasos los estudios que abordan la presencia de plásmidos en aislados de *E. coli* sensibles, siendo

---

nuestra tasa superior a las descritas. Uno de ellos es un estudio sueco en el que incluyeron una serie de 80 aislados de *E. coli* sensibles de origen urinario procedentes de 4 países europeos, detectando que el 48,5% de los aislados tenía al menos un plásmido, perteneciendo el 89% al grupo IncF. Del total de aislados, uno pertenecía al clon ST131 (138).

La mayoría de nuestros plásmidos portadores del gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> pertenecían al grupo IncF, coincidiendo con multitud de estudios que han caracterizado plásmidos de aislados ST131 productores de BLEE (tabla 42). Aunque también se han identificado a nivel mundial plásmidos de otros grupos de incompatibilidad que vehiculizan el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, como IncI1 (186), Inc N e Inc A/C (187) o plásmidos *pir-type* (191). Por otro lado, también se han caracterizado plásmidos IncF portadores de otros genes *bla*, como *bla*<sub>CTX-M-14</sub> en China y Corea del Sur (189,190) o *bla*<sub>CTX-M-27</sub> en Francia (249).

Encontramos una asociación entre los replicones de los plásmidos y la producción o no de BLEE, de modo que el 78,5% de los aislados productores de BLEE presentaba los replicones FII+FIA, lo cual coincide parcialmente con los resultados obtenidos por diferentes autores en áreas geográficas distintas, los cuales muestran que los replicones asociados con más frecuencia a *bla*<sub>CTX-M-15</sub> eran FII y FII+FIA. En cuanto a nuestros aislados ST131 no productores de BLEE, el replicón más frecuente fue FII+FIB (60,8%), dato que no podemos comparar con otros estudios, ya que apenas se han analizado plásmidos de aislados ST131 no productores de BLEE.

En cuanto a la fórmula más frecuente en los plásmidos IncF, también se encontró asociación según el aislado fuera o no productor de BLEE. Los aislados productores de BLEE presentaban en el 57% de los casos la fórmula F2:A1:B<sup>-</sup>, al igual que el plásmido pEK499, el cual es uno de los plásmidos implicados en la diseminación a nivel mundial de CTX-M-15 (145). Estos resultados son parcialmente coincidentes con los de Novais y cols., quienes encontraron que las fórmulas F2 y F2:A1:B<sup>-</sup> fueron las más frecuentes entre los aislados ST131 productores de BLEE (187). Sin embargo, entre nuestros aislados ST131 no productores de BLEE se detectó mayor variabilidad en el subtipoplasmídico, siendo los subtipos más frecuentes F2:A<sup>-</sup>:B1 y F24:A<sup>-</sup>:B1, no pudiendo comparar con otros estudios que hayan analizado plásmidos de aislados ST131 sensibles.



País(es)	Grupo(s) Inc	Replicón(es)	Gen(es) bla	Referencia
Francia, Portugal, India	IncF	FII	CTX-M-15	(67)
Kuwait	IncF	FII	CTX-M-15	(67)
UK	IncF	FII	CTX-M-15	(145)
Alemania	IncF	FII	CTX-M-15	(186)
España	IncF	FII	CTX-M-15	(187)
India	IncF	FII	CTX-M-15	(67)
India, Kuwait, Canadá, Portugal	IncF	FII-FIA	CTX-M-15	(67)
Suiza	IncF	FII-FIA	CTX-M-15	(67)
UK	IncF	FII-FIA	CTX-M-15	(145)
Noruega	IncF	FII-FIA	CTX-M-15	(250)
Bélgica	IncF	FII-FIA	CTX-M-15	(251)
España	IncF	FII-FIA	CTX-M-15	(187)
Francia	IncF	FII-FIA	CTX-M-15	(249)
Francia	IncF	FII-FIA-FIB	CTX-M-15	(67)
Noruega	IncF	FII-FIA-FIB	CTX-M-15	(250)
Alemania	Incl1	I1	CTX-M-15	(186)
España	IncN	N	CTX-M-15 y SHV-12	(187)
España	IncA/C	A/C	CTX-M-15	(187)
Australia	<i>pir-type</i>		CTX-M-15	(191)
China	IncF	FII	CTX-M-14	(189)
Corea del Sur	IncF	FIB	CTX-M-14	(190)
Corea del Sur	IncF	FII-FIA	CTX-M-14	(190)
Francia	IncF	FII-FIA-FIB	CTX-M-27	(249)

**Tabla 42.** Características de plásmidos que codifican resistencia a antimicrobianos en aislados de *E. coli*/ST131 (Adaptado de Nicolas-Chanoine y cols. (252)).

---

En nuestra área detectamos que hubo aislados productores de CTX-M-15 con el mismo pulsotipo que adquirirían plásmidos cuyas secuencias de FII eran diferentes. Esto indicaría que dentro de un linaje se producen adquisiciones del mismo tipo de plásmido en momentos diferentes lo que, como ya hemos comentado, difiere de la teoría actual de la evolución del clon. El reservorio de estos plásmidos actualmente no se conoce.

Por otra parte, encontramos dos aislados no productores de BLEE que tenían el mismo pulsotipo que un aislado productor de CTX-M-32, cuyos plásmidos no guardaban relación genética aunque tenían la misma fórmula FAB. Esto sugiere que la adquisición de genes *bla*<sub>CTX-M-32</sub> puede ocurrir en algunos aislados de forma horizontal.

Respecto al estudio de los co-determinantes de resistencia, factores de virulencia y sistemas de adicción, obtuvimos que ninguno de los plásmidos era portador de *aac(3)-II*. Sin embargo, el 62,5% de los plásmidos de aislados ST131 productores de BLEE vehiculizaban *aac(6')-Ib-cr* y *bla*<sub>OXA-1</sub>, los cuales también fueron detectados en uno de los dos plásmidos secuenciados de un aislado *E. coli* ST131 de origen australiano pJIE186 (185) y en otro estadounidense pCA14 (253). En el 71% de los plásmidos se detectaron 5 de los genes que codifican los sistemas que aseguran la promoción del plásmido y la adaptación al hospedador (*pemKI*, *ccdAB*, *parDE*, *vagCD*, *hok-sok*), de los cuales el 66% tenían la misma fórmula F2:A1:B<sup>-</sup>, por lo que se podría deducir que estos sistemas están relacionados con la transmisión del plásmido, haciendo que predominen sobre los plásmidos con distinta fórmula FAB. En torno a un 15-30% presentaban los genes de virulencia que codifican sistemas de captación del hierro y una proteína de supervivencia en suero (*iutA*, *iroN* e *iss*). Nuestros resultados son parcialmente coincidentes con los del estudio australiano y americano, es decir, detectaron todos los factores de virulencia y los genes que codifican los sistemas de adicción *ccdAB* y *srnBC* en otro plásmido del mismo aislado, mientras que en el plásmido americano estaban presentes *ituA* y *hok-sok*, *pemKI*, *ccdAB* y *vagCD*, respectivamente.

Por otro lado, los plásmidos de aislados ST131 no productores de BLEE no eran portadores de los genes de resistencia *aac(6')-Ib-cr*, *aac(3)-II* ni *bla*<sub>OXA-1</sub>, y sólo el 42,8% era portador del gen *bla*<sub>TEM-1</sub>, aunque todos vehiculizaban genes de factores de virulencia (*iutA*, *iss* e *iroN*) y en el 57% de los plásmidos se detectaron genes de 4 sistemas de adicción (*pemKI*, *ccdAB*, *hok-sok*, *srnBC*). También detectamos que estos aislados en los que el gen *aac(6')-Ib-cr* estaba ausente eran resistentes a aminoglucósidos, por lo que puede ser que estén implicadas otras transferasas.

---

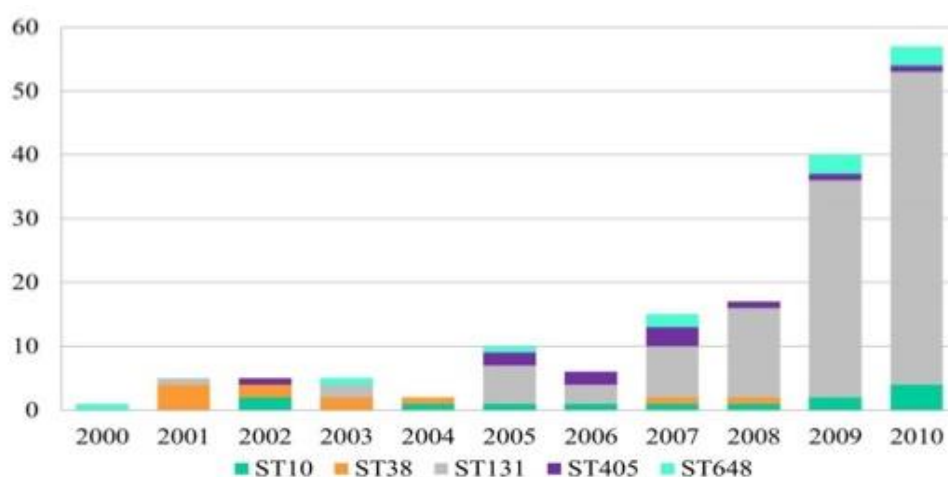
La única coincidencia entre los plásmidos de los aislados ST131 no productores de BLEE y los productores de BLEE es la presencia de los genes *pemKI*, *ccdAB*, *hok-sok*, lo que sugiere que los plásmidos portadores de estos determinantes juegan un papel en la persistencia de estos plásmidos IncF y la alta tasa de aislados con este tipo de plásmidos. Recientemente se ha identificado en un plásmido IncFII+IA de un aislado de ST131 que los sistemas *ccdAB* y *hok-sok* están incluidos dentro de la parte de RepFIA, mientras que *pemIK* está dentro de la parte de RepFII (254). Es interesante señalar que *ccdB* codifica una toxina que inhibe la girasa y mata la célula en ausencia de la anti-toxina que codifica *ccdA*. Determinadas mutaciones en *GyrA* se han visto que permiten la tolerancia a los efectos de esta toxina (255).

El hecho de que encontráramos asociados otros determinantes de resistencia a los aislados ST131 productores de BLEE y que estuvieran ausentes en los no productores, sugiere que se encuentren en una misma región de multirresistencia o elemento móvil. En el año 2011 López-Cerero y cols. describieron dicha región de multirresistencia en 7 aislados de *E. coli*, la cual contenía además del gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> otros determinantes tales como *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *tetA*, *catB3* y *aac(6')*-Ib (208).

Tras estudiar las colecciones históricas, detectamos el aislado de *E. coli* ST131 más antiguo en el año 2002, año en el que la prevalencia era del 4%. Pero al final del estudio, la prevalencia había aumentado hasta el 14,5%. Aunque el número de aislados es reducido para concluirlo, la tendencia de ST131 es aumentar con el transcurso de los años. Teniendo en cuenta estos resultados, consideramos que la emergencia de este clon en nuestra área es reciente. No hay otros estudios de características similares con los que poder comparar nuestros resultados. Coincide con Johnson y cols. quienes afirman que la diseminación de este clon se ha producido de manera reciente, ya que tras estudiar una serie de 579 aislados de *E. coli* ST131 correspondientes al período 1967-2009, contabilizaron que la mayoría de los aislados se detectaron durante los años 2000-2009 (154).

El primer aislado de *E. coli* ST131 productor de CTX-M-15 (8%) lo detectamos en el año 2006. En los años posteriores se siguieron detectando, contabilizando un 16% en el último año de estudio. El aumento de aislados de ST131 fue paralelo al de los aislados ST131 productores de CTX-M-15. En cambio, Johnson y cols. observaron en una serie de aislados de *E. coli* procedentes de 15 centros de los EE.UU un aumento significativo tanto de los aislados de *E. coli* pertenecientes al clon ST131 como de aquellos productores de

CTX-M-15. De modo que durante los años 2004-2009 se registraron el 49% y 77%, respectivamente, frente al 23% y el 8% durante los años 2000-2004 (163). Según podemos observar en la figura 38, tiene lugar una situación similar en Canadá. De modo que Peirano y cols. encuentran el primer aislado de ST131 productor de BLEE en una muestra de hemocultivo en el año 2001 y permanece estable hasta el año 2006. Sin embargo, a partir del 2007 se produce un aumento significativo de aislados ST131 productores de BLEE. De modo que durante los años 2000-2006 el 27% de los aislados de *E. coli* BLEE era ST131, mientras que durante los años 2007-2010 suponían el 69% (256).



**Figura 38.** Distribución de los clones de *E. coli* en muestras de hemocultivos detectados en la región de Calgary desde el año 2000 hasta el 2010.

Tras realizar el estudio genético de los aislados de las colecciones anteriores a la de prevalencia, observamos una situación similar. Es decir, a pesar de haber encontrado unos pocos pulsotipos múltiples (4/22) que englobaban el 48,5% de los aislados, hallamos cierta variabilidad a nivel de pulsotipo dentro del clon. Esta heterogeneidad contrasta con la reciente emergencia comentada anteriormente. En la colección de Johnson previamente citada obtuvieron menos dispersión de los aislados, de modo que los pulsotipos múltiples incluían la mayoría de la población (82%) de *E. coli* ST131 (154), lo cual coincide con la reciente emergencia.

En cuanto al análisis comparativo de los perfiles de sensibilidad de aislados ST131 respecto a los no ST131, no hemos podido extraer ninguna conclusión de relevancia, lo cual puede ser debido al reducido tamaño de la colección.

---

Cabe destacar que en los primeros años de detección (2004 y 2006) los aislados de ST131 con el mismo pulsotipo eran no productores de BLEE y sensibles a FQ. En 2007 hubo 2 aislados relacionados genéticamente que eran resistentes a FQ pero uno era productor de BLEE y otro no, y a partir de 2007 los aislados con pulsotipos similares fueron resistentes a FQ y productores de BLEE. Esta secuencia de adquisición de resistencia coincide con la anteriormente descrita por Mathers y cols., de modo que la hay una sucesión de resistencias antimicrobianas entre linajes asociados al linaje H30, desde los más sensibles hasta los más resistentes a FQ, y finalmente los resistentes a FQ y productores de CTX-M-15.

Nuestro trabajo comparte bastantes hallazgos con otros estudios que apoyan la idea general que ST131 es de emergencia reciente, supone uno de los principales patógenos comunitarios, y el linaje más importante es resistente a quinolonas. Las teorías actuales parecen atribuir el éxito de este clon a la adquisición de determinadas mutaciones, las cuales tienen lugar de forma consecutiva y producen altos niveles de resistencia, con valores de CMI superiores a otros aislados resistentes a quinolonas (257). No obstante, algunos pulsotipos detectados que engloban aislados sensibles y resistentes contemporáneos discrepan con el patrón de evolución propuesto. Por otra parte, la emergencia de ST131 en nuestro medio parece más diversa que otras partes, como en NorteAmérica. Eso puede deberse a una menor penetración del clon en nuestro medio, a una imagen más precoz de la expansión o a que existen otra fuerzas no detectadas todavía que dirigen la diseminación. Por último, la adquisición de plásmidos IncFIA, similares en estructura a plásmidos IncFIA detectados en aislados del filigrupo A y ST410, en muestras cárnicas en nuestra área, podrían indicar que la adquisición de estos plásmidos multirresistentes está ocurriendo en múltiples eventos a partir de reservorios no clínicos de estos plásmidos en linajes que ya estaban expandiéndose. Las mutaciones en las topoisomerasas podrían estar jugando un papel facilitador para la adquisición de plásmidos IncF dotados de sistemas de adicción que en otro huésped serían letales, además de jugar un papel beneficioso en condiciones de presión selectiva por un uso masivo y acumulación clínica y ambiental de FQ.

Al analizar detenidamente nuestros resultados, debemos reconocer algunas limitaciones de nuestro estudio. En primer lugar, no hemos caracterizado los aislados que no pertenecían al clon que, como hemos discutido anteriormente, podrían ser responsables también de la resistencia a FQ entre la población de *E. coli*, tales como el O15:H1:K52-ST393 o CGA-ST69. Para monitorizar la prevalencia en el futuro del clon ST131, debería de llevarse a cabo un estudio poblacional más amplio que permitiera

---

englobar el análisis no sólo de clones, sino también de los subgrupos dentro de estos clones. Actualmente existe la posibilidad de realizar estos estudios poblacionales mediante la técnica de secuenciación masiva (NGS “Next Generation Sequencing”) que permite determinar el MLST expandido, el cual tiene en cuenta más de 300 genes para la caracterización y un estudio más completo del genoma principal de cada clon. En el futuro está previsto llevar a cabo estudios de este tipo en nuestro grupo.

En relación con la metodología, hemos empleado la técnica de PFGE para conocer la epidemiología de los aislados que, como hemos comentado, es una técnica de interpretación subjetiva y vulnerable a los cambios debido a mecanismos de transferencia horizontal. El empleo de la NGS ha permitido analizar más profundamente la evolución a corto plazo y la reorganización genética que sufren los aislados de este clon, que pueden dar perfiles de PFGE diferentes aun tratándose de la misma cepa. Además, los resultados de NGS permitirían estudiar otros factores asociados a la supervivencia en superficies, adherencia a células humanas y a materiales, así como factores relacionados con la competencia con otros aislados de *E. coli* en el intestino humano.

En cuanto al papel que juegan los plásmidos, hemos observado tanto múltiple adquisición de plásmidos muy similares en un mismo pulsotipo, como diseminación del mismo plásmido entre distintos pulsotipos. Este doble fenómeno requerirá una vez más de estudios de NGS para poder conocer las regiones implicadas en la diseminación del clon, así como una mejor caracterización de todos los determinantes que vehiculizan estos plásmidos para establecer aquellos que juegan un papel en su estabilidad y fijación en las poblaciones de *E. coli*. Sería interesante también estudiar si otros clones de *E. coli* sensibles y resistentes a FQ están parasitados por plásmidos InFIB de la misma forma y qué tipos de sistemas de adicción vehiculizan.

En cuanto al papel que juegan los animales de compañía en la diseminación del clon cabe mencionar que nuestro estudio está limitado por la falta de aislados clínicos de origen animal de nuestra área. De modo que no podemos confirmar que no haya diseminación del clon a nivel local debido a la transmisión humano-animal de compañía. Para ello, sería conveniente analizar la relación genética de aislados de *E. coli* ST131 procedentes de animales de compañía y de sus dueños y, así, conocer si el clon se expande entre la población humana a través de los animales de compañía.

## 6. Conclusiones

---

---



De los resultados obtenidos en los trabajos expuestos en este proyecto de Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El clon de *E. coli* ST131 es uno de los clones prevalentes en nuestra área como causa de infección, principalmente de origen urinario.
2. La prevalencia de aislados de *E. coli* productores de BLEE pertenecientes al clon ST131 es similar al resto de aislados de *E. coli*.
3. La BLEE más prevalente en este estudio ha sido CTX-M-15, tanto en el clon como en el resto de aislados de *E. coli*.
4. En nuestra área este clon se caracteriza por ser más resistentes a fluorquinolonas y a amoxicilina clavulánico que el resto.
5. La mayoría de los aislados de *E. coli* ST131 tienen plásmidos IncF, diferenciándose los aislados productores de BLEE, que vehiculizan plásmidos FII+FIA, de los no aislados no productores de BLEE que, en cambio, vehiculizan plásmidos FII+FIB. Tanto unos como otros tienen en común sistemas de adicción, de los cuales uno de ellos (*ccdAB*) tiene relación con la actividad de la fluorquinolonas sobre las topoisomerasas. Además, la combinación de *pemKI*, *ccdAB*, *parDE*, *vagC* y *hok-sok* está relacionada con el subtipo de plásmido F2:A1:B<sup>-</sup>, por lo que se podría deducir que estos sistemas están relacionados con la transmisión del plásmido, haciendo que predominen sobre los otros subtipos de plásmidos.

- 
6. La caracterización de los plásmidos de aislados de *E. coli* ST131 productores de BLEE parece indicar múltiples adquisiciones simultáneas dentro del mismo linaje.
  7. En nuestro medio el reservorio animal no juega un papel significativo en la diseminación de ST131.
  8. La diseminación del clon ST131 es debida principalmente a pulstipos locales y los linajes de diseminación internacional juegan un papel menor. El subclon *fimH30* se ha expandido en nuestra área más frecuentemente entre aislados resistentes a FQ que otros linajes de clon ST131.
  9. Hemos encontrado otros determinantes de resistencia (*aac(6')-Ib-cr* y *bla<sub>OXA-1</sub>*) en plásmidos de aislados ST131 productores de BLEE ausentes en los no productores, por lo que puede que se encuentren en una misma región de multirresistencia que contribuya a la expansión del clon.
  10. El clon de *E. coli* ST131 es detectado en nuestra área a partir del año 2000.

## 7. Bibliografía



1. Escherich T. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant.1884. Rev Infect Dis. 1988;10(6):1220–5.
2. Cowan T. A review of names for coliform organisms. Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon. 2017;4(2):119–24.
3. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004 Feb;2(2):123–40.
4. Jorge G, Silva D, Mendonça N. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. Virulence. 2012;3(1):18–28.
5. Johnson JR, Delavari P, Stella L, Whittam TS, Carlino U, Russo TA. Molecular comparison of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of the same electrophoretic lineages from humans and domestic animals. J Infect Dis . 2001;183(10):154–9.
6. Bidet P, Mahjoub\_Messai F, Blanco J, Dehem M, Aujard Y, Bingen E BS. Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes *Escherichia coli* subtypes associated with infant urosepsis and/or meningitis. J Infect Dis. 2007;196(2):297–303.
7. de Louvois J. Acute bacterial meningitis in the newborn. J Antimicrob Chemother. 1994 Aug;34 Suppl A:61–73.
8. Mora A, López C, Dabhi G, Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, et al. human and avian

---

origin : detection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution. BMC Microbiol. 2009;9(132).

9. 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;35(11):2953–7.
10. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J Microbiol Methods. 2005;63(3):219–28.
11. Teshager T, Domínguez L, Moreno MA, Saéñz Y, Torres C CS. Isolation of an SHV-12 Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strain from a Dog with Recurrent Urinary Tract Infections. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(12):3483–4.
12. Russo TA, Johnson JR. Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. J Infect Dis. 2000;181(5):1753–4.
13. 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 [Internet]. 1999 Feb;67(2):546–53.
14. Johnson JR, Gajewski A, Lesse AJ, Russo TA. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* as a Cause of Invasive Nonurinary Infections. J Clin Microbiol. 2003;41(12):5798–802.
15. Vigil PD, Stapleton AE, Johnson JR, Hooton TM, Hodges AP, He Y. Presence of

- 
- Putative Repeat-in-Toxin Gene *tosA* in *Escherichia coli* Predicts Successful Colonization of the Urinary Tract. *MBio*. 2011;2(3):1–10.
16. Vigil PD, Alteri CJ, Mobley HLT. Identification of In Vivo -Induced Antigens Including an RTX Family Exoprotein Required for Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence □. *Infect Immun*. 2011;79(6):2335–44.
17. Spurbeck RR, Stapleton AE, Johnson JR, Walk ST, Hooton TM, Mobley HLT. Fimbrial Profiles Predict Virulence of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains: Contribution of Ygi and Yad Fimbriae □. *Infect Immun*. 2011;79(12):4753–63.
18. Fang L, Nowicki BJ, Urvil P, Goluszko P, Nowicki S, Young SL, et al. Epithelial Invasion by *Escherichia coli* Bearing Dr Fimbriae Is Controlled by Nitric Oxide-Regulated Expression of CD55. *Infect Immun*. 2004;72(5):2907–14.
19. Lindberg S, Xia Y, Sonde B, Go M, Uhlin BE. Regulatory Interactions among Adhesin Gene Systems of Uropathogenic *Escherichia coli* □. *Infect Immun*. 2008;76(2):771–80.
20. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol*. 2008;85(1):11–9.
21. Guyer DM, Radulovic S, Jones F, Mobley HLT. Sat , the Secreted Autotransporter Toxin of Uropathogenic *Escherichia coli* , Is a Vacuolating Cytotoxin for Bladder and Kidney Epithelial Cells. *Infect Immun*. 2002;70(8):4539–46.
22. Dubois D, Delmas J, Cady A, Sivignon A, Oswald E, Bonnet R. Cyclomodulins in
-

---

Urosepsis Strains of *Escherichia coli* □. J Clin Microbiol. 2010;48(6):2122–9.

23. Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Mora A, Balsalobre C, Muñoa F, Juárez A BJ. detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains:relationship with expression of adhesins and production of toxins. Res Microbiol. 1997;148(9):745–55.
24. Blanco J, Alonso MP, González EA, Blanco M GJ. virulence factors of bacteraemic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotising factor (CNF) by P-fimbriate strains. J Med Microbiol. 1990;31(3):175–83.
25. Skaar EP. The Battle for Iron between Bacterial Pathogens and Their Vertebrate Hosts. PLoS Pathog. 2010;6(8):6–9.
26. Garénaux A, Caza M DC. the ins and outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. Vet Microbiol. 2011;21(153):89–98.
27. Sukupolvi S, Connor CDO. TraT Lipoprotein , a Plasmid-Specified Mediator of Interactions between Gram-Negative Bacteria and Their Environment. Microbiol Rev. 1990;54(4):331–41.
28. Whitfield C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. Annu Rev Biochem. 2006;75(39):68.
29. Wang S, Niu C, Shi Z, Xia Y, Yaqoob M, Dai J, et al. Effects of *ibeA* Deletion on Virulence and Biofilm Formation of Avian Pathogenic *Escherichia coli* □. Infect Immun. 2011;79(1):279–87.



- 
30. Drews SJ, Poutanen SM, Mazzulli T, Mcgeer a J, Rzayev Y, Willey B, et al. Decreased Prevalence of Virulence Factors among Ciprofloxacin-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates Decreased Prevalence of Virulence Factors among Ciprofloxacin-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):4218–20.
  31. Lavigne J, Bouziges N, Chanal C, Mahamat A, Michaux-charachon S, Sotto A, et al. Molecular Epidemiology of Enterobacteriaceae Isolates Producing Extended-Spectrum Beta-Lactamases in a French Hospital. *J Clin Microbiol.* 2004;42(8):3805–8.
  32. Johnson JR, van der Schee C, Kuskowski M a, Goessens W, van Belkum A. Phylogenetic background and virulence profiles of fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* isolates from the Netherlands. *J Infect Dis.* 2002;186(12):1852–6.
  33. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML PM. *Manual of Clinical Microbiology* 9th edition. 9th ed. Press A, editor. 2007. 675-6 p.
  34. Fernández Cuenca F, López Cerero, Lorena; Pascual Hernández Á. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección Molecular typing methods for infection monitoring and control. *Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet].* 2013;31(1):20–5.
  35. 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;64(2):274–7.
  36. Gordon DM, Clermont O, Tolley H, Denamur E. Assigning *Escherichia coli* strains to
-

---

phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol* [Internet]. 2008 Oct;10(10):2484–96.

37. Hilali F, Ruimy R, Saulnier P, Lebouguéne C, Tibayrenc M, Barnabe C. Prevalence of Virulence Genes and Clonality in *Escherichia coli* Strains That Cause Bacteremia in Cancer Patients Prevalence of Virulence Genes and Clonality in *Escherichia coli* Strains That Cause Bacteremia in Cancer Patients. *Infect Immun*. 2000;68(7):3983–9.
38. Sussman M. *Escherichia coli*: Mechanisms of virulence. Press CU, editor. 1997. 639 p.
39. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(6):3140–5.
40. Nemoy LL, Kotetishvili M, Tigno J, Keefer-norris A, Harris AD, Perencevich EN, et al. Multilocus Sequence Typing versus Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates. *Society*. 2005;43(4):1776–81.
41. Orskov F OI. From the national institutes of health. Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy, and evolution of the enterobacteriaceae and other bacteria. *J Infect Dis*. 1983;148(2):346–57.
42. Ochman H, Selander R. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol*. 1984;157(2):690–3.

43. Selander RK. Population genetics of pathogenic bacteria. *Microb Pathog* [Internet]. 1987;3:1–7.
44. Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1990; 172(11):6175-81.
45. Bisercic M, Feutrier JY, Reeves PR. Nucleotide Sequences of the *gnd* Genes from Nine Natural Isolates of *Escherichia coli*: Evidence of Intragenic Recombination as a Contributing Factor in the Evolution of the Polymorphic *gnd* Locus. *J Bacteriol*. 2006;173(12):3894–900.
46. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(10):4555–8.
47. Doumith M, Day MJ, Hope R, Wain J, Woodford N. Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *J Clin Microbiol*. 2012;50(9):3108–10.
48. Luo C, Walk ST, Gordon DM, Feldgarden M, Tiedje JM, Konstantinidis KT. Genome sequencing of environmental *Escherichia coli* expands understanding of the ecology and speciation of the model bacterial species. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(17):7200–5.
49. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep*. 2013;5(1):58–65.

- 
50. Johnson JR and, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J Infect Dis [Internet]. 2000;181(1):261–72.
  51. Johnson JR. Virulence Factors in *Escherichia coli* Urinary Tract Infection. Clin Microbiol Rev. 1991;4(1):80–128.
  52. Lipsky BA, Berendt AR, Deery HG, Embil JM, Joseph WS, Karchmer AW, LeFrock JL, Lew DP, Mader JT, Nrdn C TJ. Diagnosis and treatment of diabetic foot infections. Infect Dis Soc Am. 2004;39(7):885–910.
  53. Sobel JD KD. Mandell, Douglas and Bennet's. Principles and practice of infectious diseases 5th edition. Mandell GL, Bennet JE DR, editor. Churchill Livingstone; 2000. 773-805 p.
  54. Solomkin JS, Mazuski JE, Baron EJ, Sawyer RG, Nathens AB, Dipiro JT, et al. Guidelines for the Selection of Anti-infective Agents for Complicated Intra-abdominal Infections. Clin Infect Dis. 2003;37(8):997–1005.
  55. Pitout JDD. Multiresistant Enterobacteriaceae: new threat of an old problem. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008;6:657–69.
  56. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009;27(2):116–29.
  57. Jacoby GA, Silvia Munoz-Price L. The New  $\beta$ -Lactamases. n engl j med. 2005;3524.

- 
58. Marín M GF. Antibióticos betalactámicos. EIMC. 2003;21(1):42–54.
  59. SG. W. The Chemistry of Beta-lactams. London, UK. 1992. 198-228 p.
  60. Ambler RP. The Structure of  $\beta$ -Lactamases The structure of Beta-lactamases. Source Philos Trans R Soc London Ser B, Biol Sci Phil Trans R Soc Lond B. 1980;289(289):321–31.
  61. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A Functional Classification Scheme for Beta-Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39(6):1211–33.
  62. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of Beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(3):969–76.
  63. Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, et al. Redefining extended-spectrum Beta-lactamases: Balancing science and clinical need. J Antimicrob Chemother. 2009;63(1):1–4.
  64. Livermore DM, Hawkey PM. CTX-M: Changing the face of ESBLs in the UK. J Antimicrob Chemother. 2005;56(3):451–4.
  65. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum beta-Lactamases : a Clinical Update. Clin Microbiol Rev. 2005;18(4):657–86.
  66. García A, Navarro F, Miró E, Mirelis B, Campoy S, Coll P. Characterization of the
-

---

highly variable region surrounding the blaCTX-M-9 gene in non-related *Escherichia coli* from Barcelona. J Antimicrob Chemother. 2005;56(5):819–26.

67. Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, et al. Dissemination of clonally related *E.coli* strains expressing ESBL CTX-M-15. Emerg Infect Dis. 2008;14(14):195–200.
68. Gniadkowski M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. Clin Microbiol Infect. 2001;7(11):597–608.
69. Morosini MI, Canton R, Martinez-Beltran J, Negri MC, Perez-Diaz JC, Baquero F, et al. New extended-spectrum TEM-type B-lactamase from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated in a nosocomial outbreak. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39(2):458–61.
70. Sougakoff W, GSCP. The TEM-3  $\beta$ -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. FEMS Microbiol Lett. 1988;56(3):343–8.
71. Matthews M, Hedges RW, Smith JT. Types of beta-lactamase determined by plasmids in gram-negative bacteria. J Bacteriol [Internet]. 1979;138(3):657–62.
72. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection. 1983;11(6):315–7.

- 
73. Bradford PA. Extended-spectrum Beta-lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001.
  74. 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;32(8):1243–6.
  75. Bauernfeind A, Holley M, Jungwirth R, Mangold P, Röhnisch T, Schweighart S, et al. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection*. 1992;20(3):158–63.
  76. Bonnet et al. A Novel CTX-M BetaLactamase ( CTX-M-8 ) in Cefotaxime-Resistant Enterobacteriaceae Isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(7):1936–42.
  77. 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;201(2):237–41.
  78. Bonnet R. CHRONOLOGY OF CTX-M EMERGENCE. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(1):1–14.
  79. 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;46(9):3045–9.
-

- 
80. Olson AB, Silverman M, Boyd DA, Willey BM, Daneman N, Mulvey MR, et al. Identification of a Progenitor of the CTX-M-9 Group of Extended-Spectrum  $\beta$  - Lactamases from *Kluyvera georgiana* Isolated in Guyana Identification of a Progenitor of the CTX-M-9 Group of Extended-Spectrum Beta-Lactamases from *Kluyvera georgiana* Isolated in Gu. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(5):2112–5.
  81. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum Beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(SUPPL. 1):33–41.
  82. Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related  $\beta$ -lactamase CTX-M-3. *J Antimicrob Chemother*. 2002;50(6):1031–4.
  83. R B. Growing group of extended spectrum: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agent Chemother* . 2004;48(1):1–14.
  84. Gazouli M, Sidorenko SV, Tzepeli E, Kozlova NS, Gladin DP TL. A plasmid-mediated beta-lactamase conferring resistance to cefotaxime in a *Salmonella typhimurium* clone found in St Petersburg, Russia. *J Antimicrob Chemother*. 1998;41(1):119–21.
  85. Hall LM, Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* . 1993;37(8):1637–44.
  86. Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum Beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(SUPPL. 1):42–52.



- 
87. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum Beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(3):573–81.
88. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(3):622–32.
89. Mendoza N, Ferreira E, Louro D, ARSIP Participants CM. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of extended- and broad- spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Portugal. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;34(1):29–37.
90. Piersigilli AL, Enrico MC, Bongiovanni ME, Bilbao LE, Martínez G LE. Clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* producers of extended spectrum beta-lactamases at a private institution in Cordoba. *Rev Chil Infectología.* 2009;26(4):331–5.
91. Matsumoto Y, Inoue M. Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A  $\beta$ - lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(2):307–13.
92. Silva J, Aguilar C, Ayala G, Estrada MA, Garza-Ramos U, Lara-Lemus R, et al. TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(4):997–1003.
93. Bonnet R, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, De Champs C, Viallard JL, et al. A novel
-

- 
- class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Nov;44(11):3061–8.
94. Poirel L, Brinas L, Verlinde A, Ide L, Nordmann P. BEL-1, a Novel Clavulanic Acid-Inhibited Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase, and the Class 1 Integron In120 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Sep 1;49(9):3743–8.
95. Nordmann P, Mammeri H. Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. *Future Microbiol.* 2007;2(3):297–307.
96. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-Determined AmpC-Type-Beta-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(1):1–11.
97. Alvarez M, Tran JH, Chow N, Jacoby GA. Epidemiology of Conjugative Plasmid-Mediated AmpC Beta-Lactamases in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(2):533–7.
98. Pitout JDD, Gregson DB, Church DL, Laupland KB. Surveillance for AmpC  $\beta$ -Lactamase – producing *Escherichia coli*, Calgary. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(3):443–8.
99. Bou N, Oliver A, Ojeda MAR, Monzo C, Marti S, Microbiologi S De. Molecular Characterization of FOX-4, a New AmpC-Type Plasmid-Mediated Beta-Lactamase from an *Escherichia coli* Strain Isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(9):2549–53.
100. Mata C, Miró E, Rivera A, Mirelis B, Coll P NF. Prevalence of acquired AmpC  $\beta$ -
-

- 
- lactamases in Enterobacteriaceae lacking inducible chromosomal amp C genes at a Spanish hospital from 1999 to 2007. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(5):2005–9.
101. Marchiaro P, Ballerini V, Spalding T, Cera G, Vila AJ, Viale AM, et al. A convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative carbapenemase producers. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(2):336–44.
102. Laraki N, Galleni M, Thamm I, Riccio ML, Rossolini GM, Amicosante G, et al. Integron Phyletically Related to In5 , Which Carries an Unusual Array of Gene Cassettes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(4):890–901.
103. Grundmann H, Glasner C, Albiger B , Aanensen DM, Tomlinson C, Andrasević AT, Cantón R, Carmeli Y, Friedrich AW, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Nordmann P, Poirel L, Rossolini GM, Seifert H, Vatopoulos A, Walsh T, Woodford N MDES of C-PE (EuSCAPE) WG. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(2):153–63.
104. Ortega A, Sáez D, Bautista V, Fernández-Romero S, Lara N, Aracil B, Pérez-Vázquez M, Campos J OJSCG for the ARSP. Carbapenemase-producing *Escherichia coli* is becoming more prevalent in Spain mainly because of the polyclonal dissemination of OXA-48. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(8):2131–8.
105. Goossens H, Grabein B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum Beta-lactamase- and AmpC-producing Enterobacteriaceae from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;53(4):257–64.
-

- 
106. Ángel Díaz M, Ramón Hernández J, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual Á, Martínez Peinado C, et al. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: Segundo estudio multiétnico (proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; 48(8):2840-45.
  
  107. Hernández JR, Pascual Á, Cantón R, Martínez-Martínez L, Infección Hospitalaria (GEIH) GDE De. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003;21(2):77–82.
  
  108. Romero L, López L, Rodríguez-Baño J, Ramón Hernández J, Martínez-Martínez 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;11(8):625–31.
  
  109. Schwaber MJ, Navon-venezia S, Schwartz D, Enterobacteriaceae E-, Schwaber MJ, Navon-venezia S, et al. High Levels of Antimicrobial Coresistance among Extended-Spectrum- $\beta$  High Levels of Antimicrobial Coresistance among. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(5):15–8.
  
  110. Ruiz J, Gómez J, Navia MM, Ribera A, Sierra JM, Marco F, Mensa J VJ. High prevalence of nalidixic acid resistant, ciprofloxacin susceptible phenotype among clinical isolates of *Escherichia coli* and other Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002;42(4):257–61.
  
  111. Vila J, Ruiz J, Marco F, Barcelo A, Goni P, Giralt E, et al. Association between Double Mutation in *gyrA* Gene of Ciprofloxacin-Resistant Clinical Isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(10):2477–9.
-

- 
112. Robicsek A, Jacoby GA HD. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis.* 2006;6(10):629–40.
113. Ben-ami R, Arslan H, Pitout JDD, Quentin C, Calbo ES, Azap K, et al. Multinational Survey of Risk Factors for Infection with Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase – Producing Enterobacteriaceae in Nonhospitalized Patients. *Clin Infect Dis.* 2009;49(5):682–90.
114. Andreu A, Planells I GCE para el E de la, Urinario. SA de los P. Etiology of communityacquired lower urinary infections and antimicrobial resistance of *Escherichia coli*: a national surveillance study. 2008. 12(130):481–6.
115. Rodríguez-Baño J, Alcalá JC, Cisneros JM, Grill F, Oliver A, Horcajada JP, Tórtola T, Mirelis B, Navarro G, Cuenca M, Esteve M, Peña C, Llanos AC, Cantón R PA. Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Arch Intern Med.* 2008;168(17):1897–902.
116. Briales A, Rodríguez-martínez JM, Velasco C, Alba PD De. International Journal of Antimicrobial Agents Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac (6) -Ib-cr* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum Beta-lactamases in Spain. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39(March 2006):431–4.
117. Smith CA BE. Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. *Curr drug targets Infect Disord.* 2002;2(2):143–60.
118. Galimand M, Courvalin P LT. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob*
-

---

Agent Chemother. 2003;47(8):2565–71.

119. Doi Y AY. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis*. 2007;45(1):88–94.
120. Fernandez Rodriguez A, Canton R, Perez-Diaz JC, Martinez-Beltran J, Picazo JJ, Baquero2 F. Aminoglycoside-Modifying Enzymes in Clinical Isolates Harboring Extended-Spectrum Beta-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36(11):2536–8.
121. Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, Deplano A, Vanhoof R, De Mendonca R, et al. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59(3):459–64.
122. Schmitz FJ, Verhoef J FA. Prevalence of aminoglycoside resistance in 20 European university hospitals participating in the European SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999;18(6):414–21.
123. Bell JM, Turnidge JD, Gales AC, Pfaller MA JRSASG. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-99). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002;42(3):193–8.
124. Ángel Díaz M, Ramón Hernández J, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual Á, Martínez Peinado C, et al. Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: Segundo estudio multicéntrico (proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(9):503–10.

- 
125. Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB PL. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(1):52–9.
  
  126. Brun-Buisson C, Philippon A, Ansquer M, Legrand P, Montravers F, Duval J. Transferable Enzymatic Resistance To Third-Generation Cephalosporins During Nosocomial Outbreak of Multiresistant *Klebsiella Pneumoniae*. *Lancet.* 1987;330(8554):302–6.
  
  127. Arlet G, Rouveau M, Casin I, Bouvet PJM, Lagrange PH, Philippon A. Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Strains That Produce SHV-4 1-Lactamase and Which Were Isolated in 14 French Hospitals. *J Clin Microbiol.* 1994;32(10):2553–8.
  
  128. Neuwirth C, Siebor E, Lopez J, Pechinot A, Kazmierczak A. Outbreak of TEM-24-producing *Enterobacter aerogenes* in an intensive care unit and dissemination of the extended-spectrum beta-lactamase to other members of the family enterobacteriaceae . Updated information and services can be found at: These include : *J Clin Microbiol.* 1996;34(1):76–9.
  
  129. Naumovski L, Deborah PQ, Marlynn M, Bush K, Singer SB, Graves D, et al. Outbreak of Ceftazidime Resistance Due to a Novel Extended-Spectrum Beta-Lactamase in Isolates from Cancer Patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;36(9):1991–6.
  
  130. Rasmussen BA, Bradford PA, Quinn JP, Wiener J, Weinstein RA, Bush K. Genetically diverse ceftazidime-resistant isolates from a single center: Biochemical and genetic characterization of TEM-10 Beta-lactamases encoded by different nucleotide sequences. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(9):1989–92.
-

- 
131. Fernández-Rodríguez A, Reguera JA, Pérez-Díaz JC, Picazo JJ BF. 1st Spanish epidemic of plasmid resistance to 3d generation cephalosporins: the implication of SHV-2. *EIMC*. 1992;10(8):456–61.
  132. Peña C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Liñares J, et al. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(1):53–8.
  133. Rodríguez-ban J, Paterson DL. Change in the Epidemiology of Infections Due to Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase – Producing Organisms. *Clin Infect Dis*. 2006;42:935–7.
  134. Pitout JDD, 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;38(38):1736–41.
  135. 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;40(11):4030–6.
  136. Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque TM, Pascual A. Nationwide Study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(5):2122–5.
  137. Rodríguez-baño J, Navarro MD, Martínez-martínez L, Muniain M a, Perea J, Pérez-cano R, et al. Epidemiology and Clinical Features of Infections Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Nonhospitalized Patients



- 
- Epidemiology and Clinical Features of Infections Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escher. J Clin Microbiol.* 2004;42(3):1089–94.
138. Bengtsson S, Naseer U, Sundsfjord A, Kahlmeter G, Sundqvist M. Sequence types and plasmid carriage of uropathogenic *Escherichia coli* devoid of phenotypically detectable resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(1):69–73.
139. Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK, Maas plasmids WK. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev.* 1988;52(3):375–95.
140. Dubois V, Arpin C QC. Letters to the Editor Decreased Susceptibility to Cefepime in a Clinical Strain of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(7):2380–1.
141. Heritage J, Chambers PA, Tyndall C BE. SHV-34: an extended-spectrum beta-lactamase encoded by an epidemic plasmid. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52(6):1015–7.
142. Datta N HR. R factors identified in Paris, some conferring gentamicin resistance, constitute a new compatibility group. *Ann Inst Pasteur.* 1972;123(6):849–52.
143. Carattoli A, Seiffert SN, Schwendener S. Differentiation of IncL and IncM Plasmids Associated with the Spread of Clinically Relevant Antimicrobial Resistance. *PLoS One.* 2015;10(5):1–14.
144. Johnson TJ, Nolan LK. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009;73(4):750–74.
-

- 
145. 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;53(10):4472–82.
  146. Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(12):2518–29.
  147. Novais A, Canton R, Valverde A ME, JC G, A C, F B, Coque TM. Dissemination and Persistence of bla CTX-M-9 Are Linked to Class 1 Integrons Containing CR1 Associated with Defective Transposon Derivatives from Tn 402 Located in Early Antibiotic Resistance Plasmids of IncHI2 , IncP1- $\alpha$ , and IncFI Groups. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(8):2741–50.
  148. 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;48(10):3758–64.
  149. Gonullu N, Aktas Z, Kayacan CB, Salcioglu M, Carattoli A, Yong DE, et al. Dissemination of CTX-M-15 beta-Lactamase Genes Carried on Inc FI and FII Plasmids among Clinical Isolates of *Escherichia coli* in a University Hospital in Istanbul , Turkey □. *J Clin Microbiol.* 2008;46(3):1110–2.
  150. Marcadé G, Deschamps C, Boyd A, Gautier V, Picard B, Branger C, Denamur E AG. Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(1):67–71.

151. P. E. Caracterización de aislados de *Escherichia coli* de origen clínico y alimentario productores de betalactamasas de espectro extendido. Sevilla; 2014.
152. Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(2):273–81.
153. 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;53(7):2733–9.
154. Johnson JR, Nicolas-Chanoine MH, Deb Roy C, Castanheira M, Robicsek A, Hansen G, et al. Comparison of *Escherichia coli* ST131 pulsotypes, by epidemiologic traits, 1967-2009. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(4):598–607.
155. Klemm P CG. Three *fim* genes required for the regulation of length and mediation of adhesion of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Mol Gen Genet.* 1987;20(3):439–45.
156. Dias RCS, Moreira BM, Riley LW. Use of *fimH* Single-Nucleotide Polymorphisms for Strain Typing of Clinical Isolates of *Escherichia coli* for Epidemiologic Investigation □. *J Clin Microbiol.* 2010;48(2):483–8.
157. Weissman SJ, Johnson JR, Tchesnokova V, Billig M, Dykhuizen D, Riddell K, et al. High-resolution two-locus clonal typing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(5):1353–60.

- 
158. Johnson JR, Tchesnokova V, Johnston B, Clabots C, Roberts PL, Billig M, et al. Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 2013;207(6):919–28.
159. Pitout JDD, 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;53(6):2539–43.
160. Sidjabat HE, Paterson DL, Adams-Haduch JM, Ewan L, Pasculle AW, Muto CA, et al. Molecular epidemiology of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates at a tertiary medical center in Western Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(11):4733–9.
161. Diestra K, Coque TM, Miró E, Oteo J, Juan Nicolau C, Campos J, et al. Caracterización y epidemiología molecular de betalactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en once hospitales españoles (2004). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26(7):404–10.
162. Peirano G, Richardson D, Nigrin J, Mcgeer A, Loo V, Toyne B, et al. High Prevalence of ST131 Isolates Producing CTX-M-15 and CTX-M-14 among Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates from Canada. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):1327–30.
163. Johnson JR, Urban C, Weissman SJ, Jorgensen JH, Li SL, Hansen G, et al. Molecular Epidemiological Analysis of *Escherichia coli* Sequence Type Lactamase-Producing *Escherichia coli* from the United States , 2000 to 2009. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(5):2364–70.
-

- 
164. 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;46(8):2605–12.
165. Arpin C, Quentin C, Grobost F, Cambau E, Robert J, Dubois V, Coulange L, André C. SC of O. Nationwide survey of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the French community setting. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(6):1205–14.
166. 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;54(4):735–43.
167. Suzuki S, Shibata N, YK. Change in the prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(1):72–9.
168. Matsumura Y, Johnson JR, Yamamoto M, Nagao M, Tanaka M, Takakura S, et al. CTX-M-27- and CTX-M-14-producing, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* of the H30 subclonal group within ST131 drive a Japanese regional ESBL epidemic. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(6):1639–49.
169. Blanco JJE, Mora A, Mamani R, Lopez C, Blanco M, Dahbi G, et al. National survey of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections reveals the spread of drug-resistant clonal groups O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 and CGA-D-ST69 with high virulence gene content in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(9):2011–21.
-

- 
170. Peirano G, Schreckenberger PC, Pitout JDD. Characteristics of NDM-1-producing *Escherichia coli* isolates that belong to the successful and virulent clone ST131. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(6):2986–8.
171. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis*. 2011;11(5):355–62.
172. Stoesser N, Sheppard AE, Peirano G, Sebra RP, Lynch T, Anson LW, et al. First Report of bla<sub>IMP-14</sub> on a Plasmid Harboring Multiple Drug Resistance Genes in *Escherichia coli* Sequence Type 131. *Antimicrob Agents Chemother Agent Chemother*. 2016;60(8):5068–71.
173. Morris D, McGarry E, Cotter M, Passet V, Lynch M, Ludden C, et al. Detection of OXA-48 carbapenemase in the pandemic clone *Escherichia coli* O25b:H4-ST131 in the course of investigation of an outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(7):4030–1.
174. Piazza A, Caltagirone M, Bitar I, Nucleo E, Spalla M, Fogato E, D'Angelo R, Pagani L MR. Emergence of *Escherichia coli* Sequence Type 131 (ST131) and ST3948 with KPC-2, KPC-3 and KPC-8 carbapenemases from a Long-Term Care and Rehabilitation Facility (LTCRF) in Northern Italy. *Adv Exp Med Biol*. 2016;901:77–89.
175. Stoesser N, Sheppard AE, Peirano G, Sebra R, Lynch T, Anson L, et al. Complete Sequencing of Plasmids Containing bla<sub>OXA-163</sub> and bla<sub>OXA-48</sub> in *Escherichia coli* Sequence Type 131. *Antimicrob Agents Chemother Agent Chemother*. 2016;60(11):6948–51.

- 
176. Fernández J, Montero I, Fleites A, Rosario M. Cluster of *Escherichia coli* Isolates Producing a Plasmid-Mediated OXA-48 Beta-Lactamase in a Spanish Hospital in 2012 resistance to ertapenem were recovered in a Spanish hospital from July to October 2012 . They were positive for bla OXA-48 carried. *J Clin Microbiol.* 2014;52(9):3414–7.
177. Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Claeys G, Lontie M, Van Meensel B, Herman L, Haesebrouck F BP. 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;16(2):129–34.
178. Cerquetti M, Giufrè M , García-Fernández A AM, Fortini D LI and CA. Ciprofloxacin-resistant, CTX-M-15 producing *Escherichia coli* ST131 clone in extraintestinal infections in Italy. *Clin Microbiol Infect Dis.* 2010;16(10):1555–8.
179. Uchida Y, Mochimaru T, Morokuma Y, Kiyosuke M, Fujise M, Eto F, Eriguchi Y, Nagasaki Y, Shimono N KD. Clonal spread in Eastern Asia of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* serogroup O25 strains, and associated virulence factors. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(5):444–50.
180. Lee MY, Choi HJ, Choi JY, Song M, Song Y, Kim SW, Chang HH, Jung SI, Kim YS, Ki HK, Son JS, Kwon KT, Heo ST, Yeom JS, Shin SY, Chung DR, Peck KR, Song JH, Ko KS. Lee MY1, Choi HJ, Choi JY, Song M, Song Y, Kim SW, Chang HH, Jung SI, Kim YS, Ki HK, Son JS, K KK. Dissemination of ST131 and ST393 community-onset, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clones causing urinary tract infections in Korea. *J Infect.* 2010;60(2):146–53.
181. Mathers A, Peirano G PJ. The Role of Epidemic Resistance Plasmids and
-

---

International High- Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Rev. 2015;28(3):565–91.

182. Banerjee R, Johnson JR. A new clone sweeps clean: The enigmatic emergence of *Escherichia coli* sequence type 131. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(9):4997–5004.
183. Price LB, Johnson JR, Aziz M. The Epidemic of Extended-Spectrum-  $\beta$  -Lactamase-Producing *Escherichia coli* ST131 Is Driven by a Single Highly Pathogenic Subclone, H 30-Rx. MBio. 2013;4(7):e00377-13.
184. Banerjee R, Robicsek A, Kuskowski MA, Porter S, Johnston BD, Sokurenko E, et al. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* sequence type 131 and its H30 and H30-Rx subclones among extended-spectrum-Beta-lactamase-positive and -negative *E. coli* clinical isolates from the Chicago region, 2007 to 2010. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(12):6385–8.
185. Zong Z. Complete sequence of pJIE186-2, a plasmid carrying multiple virulence factors from a sequence type 131 *Escherichia coli* O25 strain. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(1):597–600.
186. Cullik A, Pfeifer Y, Prager R, Baum H Von, Witte W. A novel IS 26 structure surrounds bla CTX-M genes in different plasmids from German clinical *Escherichia coli* isolates. J Clin Microbiol. 2010;59(5):580–7.
187. Novais Â, Pires J, Ferreira H, Costa L, Montenegro C, Vuotto C, et al. Characterization of globally spread *Escherichia coli* ST131 isolates (1991 to 2010). Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(7):3973–6.



- 
188. Kim J, Bae IK, Jeong SH, Chang CL, Lee CH, Lee K. Characterization of IncF plasmids carrying the bla CTX-M-14 gene in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. JAMA. 2011;66(6):1263–8.
189. Zong Z, Yu R, Wang X, Lu X. bla CTX-M-65 is carried by a Tn 1722 -like element on an IncN conjugative plasmid of ST131 *Escherichia coli*. J Med Microbiol. 2011;60:435–41.
190. Kim J, Bae IK, Jeong SH, Chang CL, Lee CH LK. Characterization of IncF plasmids carrying the blaCTX-M-14 gene in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. J Antimicrob Chemother. 2011;66(6):1263–8.
191. Partridge SR, Ellem JA, Tetu SG, Zong Z, Paulsen IT, Iredell JR. Complete Sequence of pJIE143 , a pir -Type Plasmid Carrying IS Ecp1-bla CTX-M-15 from an *Escherichia coli* ST131 Isolate. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(12):5933–5.
192. Naseer U, Haldorsen B, Simonsen GS, Sundsfjord A. Sporadic occurrence of CMY-2-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* of ST-complexes 38 and 448 , and ST131 in Norway. Eur Soc Clin Infect Dis. 2009;16(2):171–8.
193. Leflon-Guibout V, Blanco J, Amaqdouf K, Mora A, Guize L N-CM. 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;46(12):3900–5.
194. Blanco M, Alonso MP, Chanoine MH, Dahbi G, Mora A, Blanco JE, Lçopez C, Cortés P, Llagostera M, Leflon-Guibout V, Puentes B, Mamani R, Herrera A, Coira MA, García-Garrote F,Pita JM BJ. 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;63(6):1135–41.
195. Rooney PJ, O’Leary MC, Loughrey AC, Mccalmont M, Smyth B, Donaghy P, et al. Nursing homes as a reservoir of extended-spectrum Beta-lactamase (ESBL)-producing ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(3):635–41.
196. Vincent C, Boerlin P, Daignault D, Dozois CM, Dutil L, Galanakis C, et al. Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(1):88–95.
197. Mora A, Herrera A, Mamani R, López 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;76(21):6991–7.
198. Egea P, López-Cerero L, Navarro MD, Rodríguez-Baño J PA. 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;30(9):1045–7.
199. Egea P, López-Cerero L, Torres E, Gómez-Sánchez M del C, Serrano L, Navarro Sánchez-Ortiz MD, et al. Increased raw poultry meat colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the south of Spain. *Int J Food Microbiol.* 2012;159(2):69–73.
200. Pomba C, Da Fonseca JD, Baptista BC, Correia JD, Martínez-Martínez L. Detection
-

- 
- of the pandemic O25-ST131 human virulent *Escherichia coli* CTX-M-15-producing clone harboring the qnrB2 and aac(6')-Ib-cr genes in a dog. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(1):327–8.
201. Johnson JR, Miller S, Johnston B, Clabots C, DebRoy C. Sharing of *Escherichia coli* sequence type ST131 and other multidrug-resistant and urovirulent *E. coli* strains among dogs and cats within a household. *J Clin Microbiol.* 2009;47(11):3721–5.
202. Platell JL, Cobbold RN, Johnson JR, Heisig A, Heisig P, Clabots C, et al. Commonality among fluoroquinolone-resistant sequence type ST131 extraintestinal *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in Australia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(8):3782–7.
203. 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;65(4):651–60.
204. Clermont O, Lavollay M, Vimont S, Deschamps C, Forestier C, Branger C, et al. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(5):1024–8.
205. Simarro E, Navarro F, Ruiz J, Miró E, Gómez J MB. *Salmonella* enterica Serovar Virchow with CTX-M-Like Beta-Lactamase in Spain. *J Clin Microbiol.* 2000;38(12):4676–8.
206. Rasheed JK, Jay C, Metchock B, Berkowitz F, Weigel L, Crellin J, et al. Evolution of extended-spectrum Beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli*
-

- 
- during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(3):647–53.
207. Leflon-Guibout V, Jurand C, Bonacorsi S EF, Guelfi M H, B EB and N-CM. Emergence and Spread of Three Clonally Related Virulent Isolates of CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* with Variable Resistance to Aminoglycosides and Tetracycline in a French Geriatric Hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(10):3736–42.
208. López-Cerero L, Egea P, Serrano L, Navarro D, Mora A, Blanco J, Doi Y, Paterson DL, Rodríguez-Baño J PA. Characterisation of clinical and food animal *Escherichia coli* isolates producing CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase belonging to ST410 phylogroup A. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;37(4):365–7.
209. Johnson TJ, Wannemuehler YM, Nolan LK. Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(8):2360–9.
210. Johnson JR, Russo TA, Tarr PI, Bilge SS, Jr JCV, Stell AL, et al. Molecular Epidemiological and Phylogenetic Associations of Two Novel Putative Virulence Genes , *iha* and *iroN* *E . coli* among *Escherichia coli* Isolates from Patients with Urosepsis Molecular Epidemiological and Phylogenetic Associations of Two Novel Putat. *Infect Immun.* 2000;68(5):3040–7.
211. Mnif B, Vimont S, Boyd A, Bourit E, Picard B, Branger C, et al. Molecular characterization of addiction systems of plasmids encoding extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(8):1599–603.
212. 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. 2009;62(6):1241–4.
213. 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;11(1):54–61.
214. Wayne. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: twentieth Informational Supplement M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
215. García-Fernández A CA. Plasmid double locus sequence typing for IncHI2 plasmids, a subtyping scheme for the characterization of IncHI2 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamase and quinolone resistance genes. J Antimicrob Chemother. 2010;65(6):1155–61.
216. Gibreel TM, Dodgson AR, Cheesbrough J, Fox AJ, Bolton FJ, Upton M, et al. Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest England. J Antimicrob Chemother. 2012;67(2):346–56.
217. Johnson JR, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Castanheira M. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. Clin Infect Dis. 2010;51(3):286–94.
218. Banerjee R, Strahilevitz J, Johnson JR, Payal P, Robicsek A. *Escherichia coli* Sequence Type 131 Is a Dominant, Antimicrobial-Resistant Clonal Group Associated
-

- 
- with Healthcare and Elderly Hosts. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2014;34(9):947–53.
219. Blanco J, Mora A, Mamani R, López C, Blanco M, Dahbi G, et al. Four main virotypes among extended-spectrum-Beta-lactamase-producing isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: Bacterial, epidemiological, and clinical characteristics. *J Clin Microbiol*. 2013;51(10):3358–67.
220. Peirano G, Richardson D, Nigrin J, Mcgeer A, Loo V, Teye B, et al. High Prevalence of ST131 Isolates Producing CTX-M-15 and CTX-M-14 among Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates from Canada □. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):1327–30.
221. Pitout JDD, Gregson DB, Campbell L, Laupland KB. Molecular Characteristics of Extended-Spectrum-Beta  $\beta$ -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;53(7):2846–51.
222. Peirano, Gisele, Costello M PJ. 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;36(1):19–23.
223. Chung H, Lai C, Lin J, Huang C, Liang S, Chen W, et al. *Escherichia coli* Sequence Type ST131 and Non-ST131 Clones : Comparison of Demographic Data , Clinical Features , and Mortality. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(2):618–22.
-

- 
224. Oteo J, Orden B, Bautista V, Cuevas O, Arroyo M, Martínez-Ruiz R, Pérez-Vázquez M, Alcaraz M, García-Cobos S CJ. CTX-M-15-producing urinary *Escherichia coli* O25b-ST131-phylogroup B2 has acquired resistance to fosfomicin. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(4):712–7.
225. Tian GB, Garcia J, Adams-Haduch JM, Evangelista JP, Destura RV, Wang HN DY. CTX-M as the predominant extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae in Manila, Philippines. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(3):584–6.
226. Peirano G, Asensi MD, Pitondo-Silva A, Pitout JDD. Molecular characteristics of extended-spectrum Beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(7):1039–43.
227. Díaz MA. Diversity of *Escherichia coli* Strains Producing Extended-Spectrum Beta - Lactamases in Spain : Second Nationwide Study. *J Clin Microbiol.* 2010;48(8):2840–5.
228. Peirano G, Bij AK Van Der, Freeman JL, Poirel L, Nordmann P, Costello M. Characteristics of *Escherichia coli* Sequence Type 131 Isolates That Produce Extended-Spectrum Beta-Lactamases : Global Distribution of the. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(7):3762–7.
229. Sherchan JB, Hayakawa K, Miyoshi-akiyama T, Ohmagari N, Kirikae T, Nagamatsu M, et al. Clinical Epidemiology and Molecular Analysis of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Nepal: Characteristics of. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):3424–32.
-

- 
230. Rodrigues C, Machado E, Pires J, Ramos H, Novais A PL. Increase of widespread A, B1 and D *Escherichia coli* clones producing a high diversity of CTX-M-types in a Portuguese hospital. *Future Microbiol.* 2015;10(7):1125–31.
231. Lafoile J, Nicolas-Chanoine MH, Grenouillet F, Hocquet D BX. prevalence of *Escherichia coli* sequence type 131 and its H30 subclone among *Escherichia coli* isolates in a French hospital. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44(5):466–8.
232. Roy S, Datta S, DAS P, Gaiind R, Pal T, Tapader R, Mukherjee S BS. Insight into neonatal septicaemic *Escherichia coli* from India with respect to phylogroups, seotypes, virulence, extended-spectrum-B-lactamases and association of ST131 clonal group. *Epidemiol Infect.* 2015;143(15):3266–76.
233. Rafai C, Frank T, Manirakiza A, Gaudeuille A, Mbecko J, Nghario L, et al. Dissemination of IncF-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae isolates from surgical-site infections in Bangui , Central African Republic. *BMC Microbiol.* 2015;15(1):15.
234. Hristea A, Olaru ID, Adams-Sapper S RL. Characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from bloodstream infections in three hospitals in Bucharest, Romania: a preliminary study. *Infect Dis (London, England).* 2015;47(1):46–51.
235. Rogers BA, Ingram PR, Runnegar N, Pitman MC, Freeman JT, Athan E, Havers S, Sidjabat HE, Gunning E, De Almeida M, Styles K PDAC. Sequence type 131 fimH30 and fimH41 subclones amongst *Escherichia coli* isolates in Australia and New Zealand. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;45(4):351–8.
-



- 
236. Ho PL, Chu YP, Lo WU, Chow KH, Law PY, Tse CW, Ng TK, Cheng VC QT. High prevalence of *Escherichia coli* sequence type 131 among antimicrobial-resistant *E. coli* isolates from geriatric patients. *J Med Microbiol.* 2015;64(pt 3):243–7.
237. Vlieghe ER, Phe T, Bogaerts P, Berhin C, Smet B De, Peetermans WE, et al. Prevalence and distribution of beta-lactamase coding genes in third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae from bloodstream infections in Cambodia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;1223–9.
238. Zhang F, Zhu D, Xie L, Guo X, Ni Y SJ. Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and the prevalence of ST131 subclone H30 in Shanghai, China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(6):1263–9.
239. Brisse S, Diancourt L, Laouénan C, Vigan M, Caro V, Arlet G, et al. Phylogenetic Distribution of CTX-M- and Non-Extended-Spectrum- Beta- Lactamase-Producing. *J Clin Microbiol.* 2012;50(9):2974–81.
240. Oteo J, Ortega A, Cercenado E, Navarro F, Oliver A. Isolates Resistant to Amoxicillin-Clavulanate Are More Clonal and Possess Lower Virulence Gene Content than Susceptible Clinical. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(7):3874–81.
241. Torres E, López-Cerero L, Rodríguez-Martínez JM PÁ. Reduced Susceptibility to cefepime in clinical isolates of Enterobacteriaceae producing OXA-1 beta-lactamase. *Microb Drug Resist.* 2016;22(2):141–6.
242. Lee MY, Choi HJ, Choi JY, Song M, Song Y, Kim SW, Chang HH, Jung SI, Kim YS, Ki HK, Son JS, Kwon KT, Heo ST, Yeom JS, Shin SY, Chung DR, Peck KR, Song JH KK. Dissemination of ST131 and ST393 community-onset, ciprofloxacin-resistant
-

---

*Escherichia coli* clones causing urinary tract infections in Korea. J Infect. 2010;60(2):146–53.

243. Platell JL, Cobbold RN, Johnson JR, Trott DJ. Clonal group distribution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* among humans and companion animals in Australia. J Antimicrob Chemother. 2010;65(9):1936–8.
244. Jones GL, Warren RE, Skidmore SJ, Davies VA, Gibreel T UM. Prevalence and distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Escherichia coli* lacking extended-spectrum beta-lactamases. J Antimicrob Chemother. 2008;62(6):1245–51.
245. Shapiro BJ. How clonal are bacteria over time ? Curr Opin Microbiol. 2016;31:116–23.
246. Stoesser N SA, L P, De Maio N MN, C S, Turner R, Anson P KL, A B, et al. Evolutionary History of the Global Emergence of the *Escherichia coli* Epidemic Clone ST131. MBio. 2016;7(2):1–15.
247. Zakour NL Ben, Alsheikh-hussain AS, Ashcroft MM, Khanh T, Roberts LW. Sequential Acquisition of Virulence and Fluoroquinolone Resistance Has Shaped the Evolution of *Escherichia coli* ST131. MBio. 2016;7(2):1–11.
248. Guo S, Brouwers HJM, Cobbold RN, Platell JL, Chapman TA, Barrs VR, et al. Fluoroquinolone-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* , including O25b-ST131 , isolated from faeces of hospitalized dogs in an Australian veterinary referral centre. JAMA. 2013;68(5):1025–31.

- 
249. Blanc V, Leflon-Guibout V, Blanco J, Haenni M, Madec JY, Rafteron G, Bruno P, Mora A, López C, Dahbi G, Dunais B, Anastay M, Branger C, Moreau R, Pradier C N-CM. Prevalence of day-care centre children (France) with faecal CTX-M-producing *Escherichia coli* comprising O25b:H4 and O16:H5 ST131 strains. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(5):1231–7.
250. NASEER U, BJØRG HALDORSEN, STALE TOFTELAND, KRISTIN HEGSTAD, FLEMMING SCHEUTZ, GUNNAR SKOV SIMONSEN AS and TNESG. Molecular characterization of CTX-M-15-producing clinical isolates of *Escherichia coli* reveals the spread of ( O102 : H6 ) strains in Norway. *APMIS.* 2009;117(January):526–36.
251. Montesinos I, Rodríguez-Villalobos H, De Mendoça R, Bogaerts P, Deplano A GY. Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase associated with the ST131 *Escherichia coli* clone in Belgium. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(8):1828–30.
252. Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev.* 2014;
253. Li J, Sychala CN, Hu F, Sheng J, Doi Y. Complete Nucleotide Sequences of *bla* CTX-M -Harboring IncF Plasmids from Community-Associated *Escherichia coli* Strains in the United. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):3002–7.
254. Phan MD, Forde BM, Peters KM, Sarkar S, Hancock S. Molecular Characterization of a Multidrug Resistance IncF Plasmid from the Globally Disseminated *Escherichia coli* ST131 Clone. *PLoS One.* 2015;131:1–17.
255. Miki T, Park JA, Nagao K, Murayama N HT. Control of segregation of chromosomal
-

---

DNA by sex factor F in *Escherichia coli*. Mutants of DNA gyrase subunit A suppress letD (ccdB) product growth inhibition. *J Mol Biol.* 1992;225(1):39–52.

256. Peirano G, Bij AK Van Der, Gregson DB, Pitout JDD. Molecular Epidemiology over an 11-Year Period (2000 to 2010) of Extended-Spectrum -Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Causing Bacteremia in a Centralized Canadian Region. *J Clin Microbiol.* 2012;50(2):294–9.
257. Johnson JR, Johnston B, Kuskowski MA, Sokurenko EV T V. Intensity and Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance within the H30 and H30Rx Subclones of *Escherichia coli* Sequence Type 131 Compared with Other Fluoroquinolone-Resistant *E. coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(8):4471–80.

## 8. Anexo

---

---

## Anexo 1. Producción científica

### Publicaciones en revistas derivadas del trabajo en el laboratorio

1. López-Cerero L, **Bellido M**, Serrano L, Liró J, Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Pascual A. *Escherichia coli* O25b:H4/**ST131** are prevalent in Spain and are often not associated with ESBL or quinolone resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013 Jun-Jul;31(6):385-8.
2. López-Cerero L, Navarro MD, **Bellido M**, Martín-Peña A, Viñas L, Cisneros JM, Gómez-Langley SL, Sánchez-Monteseirín H, Morales I, Pascual A, Rodríguez-Baño J. *Escherichia coli* belonging to the worldwide emerging epidemic clonal group O25b/ST131: risk factors and clinical implications. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Mar;69(3):809-14.
3. Pomba C, López-Cerero L, **Bellido M**, Serrano L, Belas A, Couto N, Cavaco-Silva P, Rodríguez-Baño J, Pascual A. Within-lineage variability of ST131 *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in the south of Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Jan;69(1):271-3.
4. Morales-Barroso I, López-Cerero L, Molina J, **Bellido M**, Navarro MD, Serrano L, González-Galán V, Praena J, Pascual A, Rodríguez-Baño J. Bacteraemia due to non-ESBL-producing *Escherichia coli* O25b:H4 sequence type 131: insights into risk factors, clinical features and outcomes. *Int J Antimicrob Agents*. 2017 Apr;49(4):498-502.

---

---



