

---

*Escherichia coli* patógeno extra intestinal (ExPEC):  
Atributos de virulencia, Epidemiología Molecular y  
Resistencia a Antibióticos

Tesis de Doctorado

PEDECIBA

Área Biología, Sub-área Microbiología

Rafael Vignoli

Orientador: Dr. Alejandro Chabalgoity

Co-orientador: Dr. Gabriel Gutkind

Departamento de Bacteriología y Virología  
Instituto de Higiene-Facultad de Medicina  
Montevideo-Uruguay

---

## Abreviaturas:

ABC	ATP binding cassette
AMM	Alta Más a Molecular
AUC ROC	Area bajo la Curva ROC
BLEA	$\beta$ -lactamasa de Espectro Ampliado
BLEE	$\beta$ -lactamasa de Espectro Extendido
BMM	Baja Más a Molecular
CEACAMs	Moléculas de antígeno carcinoembrionario relacionado a adhesión celular
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CNF-1	Factor necrosante de toxicidad tipo 1
DAF	Decay Accelerating Factor
Dam	deoxi-adenosin metiltransferasa
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ExPEC	<i>E. coli</i> patógenas extra intestinales
GCA	Grupo Clonal A
GF	Grupos Filogenéticos
GRTFQ	Genes de Resistencia Transferibles a Fluoro Quinolonas
GTPasa	guanosina trifosfatasa
IS	Secuencia de Inserción
ITU	Infección del Tracto Urinario
MATE	Multidrug And Toxic-compound Extrusion
MFS	Major Facilitator Superfamily
MLST	Multi Locus Sequence Typing (Tipificación de Secuencias Multi Locus)
MPS	Muerte Post Segregacional
MR	Manosa Resistente
MRD	Multi Resistentes a Drogas
MS	Manosa Sensible
NAcGlc	N-acetil glucosamina
NAcMur	N-acetilmurámico
NADPH	Nicotinamida Adenin di nucleótido fosfato forma reducida
PBP	Penicillin Binding Proteins (Proteínas de unión a la Penicilina)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PFGE	Pulse Field Gel Electrophoresis (Electroforesis de Campo Pulsado)
RDRQ	Región Determinante de Resistencia a Quinolonas
RND	Resistance Nodulation Division
PRD	Pan Resistencia a Drogas
SMR	Small Multidrug Resistance
SST1	Sistema de secreción tipo 1
SST4	Sistema de Secreción tipo 4
STA	Sistemás Toxina Antitoxina
TV+	Tamizaje de Virulencia positivas
TV-	Tamizaje de Virulencia negativo
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
XRD	Extrema Resistencia a Drogas

# Índice

1. Resumen _____	8
2. Introducción _____	11
2.I_ <i>E. coli</i> _____	12
2.II_ Atributos de Virulencia _____	12
2.II.A_ Factores relacionados a adhesión _____	12
2.II.A.a_ Fimbrias Manosa Resistentes _____	13
2.II.A.a.i_ Fimbrias P _____	13
2.II.A.a.ii_ Fimbrias Afa/Dr _____	15
2.II.A.a.iii_ Fimbrias S/F1C _____	16
2.II.A.b_ Fimbrias Manosa Sensibles _____	17
2.II.A.b.i_ Fimbrias tipo 1 _____	17
2.II.B_ Moléculas que producen daño en el huésped _____	18
2.II.B.a_ $\alpha$ hemolisina _____	18
2.II.B.b_ Factor Necrosante de toxicidad tipo 1 CNF-1_	19
2.II.C_ Factores que favorecen la sobrevivencia del microorganismo durante la infección _____	21
2.II.C.a_ Sistemás de captación de hierro _____	21
2.II.C.b_ Cápsula _____	24
2.III_ Caracterización de ExPEC _____	26
2.III_ Antibióticos $\beta$ -lactámicos _____	27
2.III.A_ Estructura química _____	27
2.III.B_ Sitio blanco “El peptidoglicano” _____	29
2.III.B.a_ Etapa citoplasmática _____	29
2.III.B.b_ Etapa transmembrana _____	30
2.III.B.c_ Etapa extracelular _____	30
2.III.C_ Mecanismo de Acción _____	32

	Índice
2.III.D_Penicilinas_____	33
2.III.E_Cefalosporinas_____	33
2.III.F_Inhibidores de $\beta$ -lactamasas_____	34
2.III.G_Mecanismos de Resistencia_____	35
2.III.G.a_Alteración del sitio blanco_____	35
2.III.G.b_Impermeabilidad y eflujo_____	36
2.III.G.c_Producción de $\beta$ -lactamasas_____	36
2.III.G.c.i_Clasificación_____	36
2.III.G.c.ii_Modificaciones del perfil de sustrato_	38
2.III.G.c.iii_Movilización de BLEE tipo CTX-M_	40
2.IV_Quinolonas_____	41
2.IV.A_Estructura química_____	41
2.IV.B_Sitio blanco “Las topoisomerasas”_____	42
2.IV.C_Mecanismo de acción_____	44
2.IV.D_Mecanismos de Resistencia_____	45
2.IV.D.a_Alterción del sitio blanco_____	45
2.IV.D.b_Disminución de la captación_____	45
2.IV.D.b.i_Alteración de la permeabilidad_____	46
2.IV.D.b.ii_Bombas de eflujo_____	46
2.IV.D.c_Mecanismos transferibles de resistencia_____	47
2.IV.D.c.i_Enmás caramiento de sitio blanco_____	47
2.IV.D.c.ii_Inactivación enzimática_____	48
2.IV.D.c.iii_Bombas de eflujo_____	49
2.IV.D.d Evidencia del impacto de la Resistencia	
De bajo nivel_____	50
2.V_Multi resistencia, Resistencia extrema y Pan resistencia a drogas____	50
2.VI_Movilización de genes de resistencia_____	51
2.VI.A_Diseminación vertical_____	51
2.VI.A.a_Sistemás Toxina-Antitoxina (TA) o de adicción_	52
2.VI.B_Diseminación Horizontal_____	53
2.VI.C_Costo Biológico_____	54
2.VII_BLEE y resistencia transferible a quinolonas en Uruguay_____	55
2.VIII_ <i>E. coli</i> virulencia y resistencia a antibióticos_____	55
3_Hipótesis y Objetivos_____	57

3.I_Hipótesis_____	58
3.II_Objetivos generales_____	58
3.III_Objetivos específicos_____	58
4_Materiales y Métodos_____	59
4.I_Cepas bacterianas_____	60
4.II_Cepas en estudio_____	60
4.III_Identificación bacteriana, estudios de sensibilidad a antibióticos y detección fenotípica de BLEE_____	60
4.IV_Extracción de ADN_____	61
4.V_Detección de BLEE y mecanismos transferibles de resistencia a Quinolonas_____	61
4.VI_Ensayos de conjugación plasmídica_____	62
4.VII_Determinación de grupos de incompatibilidad plasmídica, y de sistemás de adicción asociados a plásmidos conjugativos_____	64
4.VIII_Secuenciación de un plásmido portador de CTX-M-14_____	65
4.IX_Determinación de grupo filogenético y detección de factores de Virulencia_____	66
4X_Tipificación por análisis de Secuencias Multi Locus (MLST)_____	69
4XI_Tipificación mediante Electroforesis en Gel de Agarosa en Campo Pulsado (PFGE)_____	69
4XII_Detección del Grupo clonal A mediante Polimorfismo Simple de Nucleótidos (SNP) del gen <i>fumC</i> _____	71
4.XIII_Análisis estadísticos_____	71
5_Resultados y Discusión_____	72
5.I_Determinación de fenotipos de resistencia_____	73
5.II_Cepas productoras de BLEE y sensibilidad a oximinocefalosporinas	76
5.III_Determinación de BLEE y RTQ en ExPEC_____	78
5.IV_Tipificación molecular y caracterización clonal_____	79
5.V_Detección de Grupo Clonal A (GCA)_____	82
5.VI_Transferencia plasmídica, Grupos de incompatibilidad y Sistemás Toxina Antitoxina_____	85
5.VII_Secuenciación del plásmido pEc07 codificante de CTX-M-14____	89
5.VII.A_Región de Resistencia_____	91
5.VIII_Detección de factores de virulencia y relación con la resistencia a	

	Índice
antibióticos_____	97
5.IX_Probabilidad de sensibilidad a fluoroquinolonas y oximino- cefalosporinas en función del perfil de genes de virulencia_____	103
5.X_Determinación de ST en aislamientos con alto contenido de GV y sensibles a fluoroquinolonas y oximinocefalosporinas_____	108
6_Conclusiones y Perspectivas_____	112
7_Presentaciones a Congresos y Publicaciones_____	115
8_Bibliografía_____	116
9_Copia de Artículos Publicados_____	139

# I\_Resumen

*E. coli* es uno de los microorganismos más importante en salud humana, pudiendo formar parte de la microbiota intestinal, o causar infecciones intestinales y extraintestinales. Dentro de las últimas se encuentran infecciones del tracto urinario, sepsis, bacteriemias, meningitis, infecciones de sitio quirúrgico entre otras. La capacidad de causar estas infecciones se relaciona a la presencia de diversos factores de virulencia como ser: 1- estructuras de adherencia que favorecen la unión a distintos epitelios, 2- moléculas que dañan al huésped, favoreciendo la invasión, multiplicación y diseminación de los microorganismos y 3- factores que favorecen la supervivencia del microorganismo frente a la respuesta inmune, la actividad bactericida del suero y las condiciones restrictivas de nutrientes esenciales como el hierro.

La determinación de grupos filogenéticos (GF), ha sido propuesta como una primera aproximación para diferenciar patógenos de comensales. En este sentido se describen cuatro GF denominados A, B1, B2 y D. Las *E. coli* patógenas extra intestinales (ExPEC) pertenecen mayoritariamente a los GF B2 y D, mientras que las que forman parte de la microbiota intestinal al GF A y B1.

Una segunda aproximación se basa en la determinación de presencia/ausencia de genes de virulencia. Con este criterio, son ExPEC aquellas cepas que presenten dos o más de los seis genes de virulencia *papA* y *papC*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA*, *kpsM II*. Le denominamos a estas cepas TV+ (Tamizaje de Virulencia positivas).

Por otro lado, en la última década se ha observado en los patógenos urinarios un paulatino aumento de la resistencia a antibióticos. Se ha propuesto que estos pueden deberse fundamentalmente a dos aspectos: 1-La presión de selección que ejerce el uso indiscriminado de determinado grupo de antibióticos 2- La diseminación de una clona particularmente resistente. Poder discernir cuál de estos dos componentes es el preponderante en una región toma importancia en la medida que puede modificar conductas profilácticas y terapéuticas.

Dentro de los antibióticos más utilizados para el tratamiento de las infecciones por ExPEC se encuentran fluoroquinolonas y oximinocefalosporinas. En particular el aumento de la resistencia a fluoroquinolonas es un problema de alta relevancia debido, por un lado, a que es una de las drogas de primera línea en estas infecciones y, por otro, a la reciente aparición de mecanismos de resistencia transferibles a estos antibióticos.

La resistencia a oximinocefalosporinas, mediada por la producción de  $\beta$ -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) es el principal mecanismo de resistencia transferible a oximinocefalosporinas; mientras que la modificación enzimática mediada por la enzima acetilante de aminoglucósidos y fluoroquinolonas, Aac (6') Ib-cr y el enmascaramiento del sitio blanco mediado por las proteínas Qnr lo son para las fluoroquinolonas.

Por otra parte, se ha observado que la presencia de resistencia a quinolonas se asocia a aislamientos que presentan una menor cantidad de atributos de virulencia. Este fenómeno se ha intentado explicar o bien por cierta incompatibilidad entre la resistencia a estos antibióticos y la presencia de determinados factores de virulencia, o bien por la pertenencia de las cepas resistentes a clones diferentes de las sensibles. Sin embargo, esto podría no ser una generalidad, en tanto clones emergentes como *E. coli* ST131, y el denominado Grupo Clonal A (GCA) ampliamente diseminados a nivel mundial son ejemplos de coexistencia de multiresistencia y atributos de virulencia.

Considerando estos antecedentes, en este trabajo nos propusimos por un lado determinar si las cepas circulantes en Uruguay tienen o no una distribución clonal y por otro, verificar



o rechazar la hipótesis de que los aislamientos de ExPEC portadores de BLEE y/o resistentes a fluoroquinolonas, presentan menor cantidad de factores de virulencia que su contraparte sensible.

Se estudiaron 55 aislamientos de *E. coli* productores y 109 no productores de BLEE provenientes de muestras clínicas obtenidas de pacientes atendidos en dos centros de Montevideo y uno del Departamento de Colonia. La detección de genes de resistencia transferibles a quinolonas y BLEE, de los grupos de incompatibilidad plasmídica y sistemas de toxina-antitoxina o de adicción, así como la determinación de GF y búsqueda de genes de virulencia se realizó por PCR. La clonalidad de los aislamientos portadores de BLEE se realizó mediante PFGE y MLST. La identificación del grupo clonal A se realizó mediante SNP para el gen *fumC*, para aquellos aislamientos que siendo del grupo filogenético D se les realizó MLST. Por otro lado, se analizó la movilidad de los genes de resistencia mediante ensayos de conjugación y secuenciación de un plásmido portador de CTX-M-14.

Los resultados encontrados muestran que dentro de las cepas productoras de BLEE, 37 presentaban *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (67,3%), 8 *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (14,6%), 5 *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (9,1%), 3 *bla*<sub>CTX-M-2</sub> y *bla*<sub>CTX-M-14</sub> juntas, una *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, y una *bla*<sub>CTX-M-8</sub>. En relación a la clonalidad de estos aislamientos, si bien se detectaron 15 pulsotipos, dos de ellos (denominados A y B) concentraron el 92% (34/37) de los productores de CTX-M-15. Estos pulsotipos pertenecían a los ST ST131 y ST405, y portaban *aac* (6') *Ib-cr*. Los aislamientos portadores de *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub> o *bla*<sub>CTX-M-8</sub> no estaban relacionados genéticamente.

Los ensayos de conjugación se realizaron sobre 25 aislamientos, y se obtuvieron tranconjugantes de CTX-M-14 (8/8), dos de CTX-M-15 (2/7), uno de CTX-M-2 (1/8) y los codificantes de CTX-M-9 y CTX-M-8. Las 8 CTX-M-14 se encontraban en plásmidos conjugativos, en general IncII y asociados al sistema de adicción *pndAC*. El plásmido pEc07 presentó un tamaño de 106.854 pb donde se incluía una región de transferencia de 55467pb y una región de resistencia de 13281 pb, constituida por: tres copias de IS26, y una de cada una de *ISEcp1*, *IS10* e *IS903*) y los genes de resistencia a: macrólidos (*ermBC*) y  $\beta$ -lactámicos *bla*<sub>TEM-1</sub> y *bla*<sub>CTX-M-14</sub>.

En relación a la presencia de factores de virulencia, de los 164 aislamientos estudiados, 103 fueron TV+, encontrándose una fuerte asociación entre pertenecer a los GFs B2 y D y ser TV+ ( $p < 0,001$ ; RR: 15,0 IC95% 6,4-35,3). Sin embargo, los aislamientos TV- se asociaron con resistencia a ciprofloxacina ( $p < 0,001$ ; OR=3,7, IC95% 1,89-7,13), ácido nalidíxico, gentamicina y trimetoprim sulfametoxazole.

Finalmente se intentó buscar la potencial asociación de resistencia y presencia de genes de virulencia. Los resultados obtenidos muestran que la presencia de los genes *papA*, *papC*, *papEF*, *papGII-III*, *papGII*, *sfa/foc*, *fyuA*, y *K1*, se asoció a sensibilidad a fluoroquinolonas y oximinocefalosporinas. El AUC ROC utilizando el modelo con los genes asociados a sensibilidad fue de 0.930, la sensibilidad del 78.9% y la especificidad del 90.6% cuando se considera tener 3 o más genes de virulencia (GV). La resistencia a ciprofloxacina en esta población fue de 5,1% mientras que en aquellos con menos de 3 GV fue de 65.9%.

Conclusiones: la diseminación exitosa de *E. coli* productor de CTX-M-15 estaría asociada a la diseminación de clones de alto riesgo como ST131 y ST405, en menor medida a la transferencia horizontal, mientras que las CTX-M del grupo 4 se relacionarían a la diseminación plasmídica y la presencia de sistemas de adicción.

Los aislamientos sensibles a ciprofloxacina son significativamente más virulentos que aquellos resistentes, incluso entre aquellos que pertenecen a los mismos secuenciotipos. La alta diseminación clonal dentro de las cepas resistentes permite pensar en la utilización de vacunas que pudieran disminuir la incidencia de estos clones predominantes en determinadas poblaciones susceptibles a dichas infecciones.

## **2\_Introducción**

## **2\_ Introducción:**

### **2.I\_ *Escherichia coli***

El Género *Escherichia* pertenece a la Familia *Enterobacteriaceae* y está compuesto por 8 especies: *E. faecalis*, *E. blattae*, *E. senegalensis*, *E. hermannii*, *E. fergusonii*, *E. albertii*, *E. vulneris* y *E. coli*.

Si bien las especies *E. hermannii*, *E. fergusonii*, *E. albertii*, y *E. vulneris* han sido relacionadas a patología infecciosa en humanos,<sup>1-4</sup> es *E. coli* uno de los microorganismos más importante en salud humana, ya que puede ser encontrado tanto como uno de los principales integrantes de la microbiota aerobia anaerobia facultativa del tracto digestivo en humanos, como causante de infecciones intestinales y extraintestinales.

Dentro de las infecciones extraintestinales las más frecuentes son las infecciones del tracto urinario (ITU), pero también pueden dar lugar a cuadros de sepsis, bacteriemias, meningitis, infecciones de sitio quirúrgico entre otras.

La capacidad de causar infecciones extra intestinales se relaciona de un modo estrecho a la presencia de diversos agrupamientos de factores de virulencia que incluye: 1- estructuras de adherencia que favorecen la unión a distintos epitelios (urotelio, epitelio vaginal etc.), 2- moléculas que producen daño en el huésped, favoreciendo la invasión, multiplicación y diseminación de los microorganismos y 3- moléculas que permiten la supervivencia del microorganismo frente a la respuesta inmune, la actividad bactericida del suero y a condiciones restrictivas del hierro <sup>5, 6, 7</sup>

### **2.II\_ *E. coli*: Factores de Virulencia:**

#### **2.II.A\_ Factores relacionados a adhesión:**

La adherencia es el primer paso para la colonización y posterior infección.

Las adhesinas pueden clasificarse de acuerdo a su estructura en filamentosas (fimbrias) o no filamentosas.

Una segunda clasificación puede realizarse en función de su capacidad de reconocer manosidos como receptores. Aquellas fimbrias cuya capacidad de adherencia o de hemaglutinación puede ser inhibida por el agregado de manosa o proteínas ricas en dicho

azúcar (como proteína de Tamm-Horsfall), se les denomina manosa sensibles (MS). Es el caso por ejemplo de las fimbrias tipo 1. Aquellas fimbrias que mantienen su capacidad de adhesión o hemaglutinación en presencia de manosa se le denomina manosa resistentes (MR) <sup>8</sup>

Dentro de las adhesinas más frecuentemente asociadas a ExPEC se encuentran:

- a) Fimbria P
- b) Fimbria Afa/Dr
- c) Fimbria S
- d) Fimbria F1C
- e) Fimbria tipo 1

## 2.II.A.a\_ Fimbrias Manosa Resistentes:

### 2.II.A.a.i\_ fimbrias P:

Las fimbrias P están codificadas por los clusters de genes *pap* (Pili asociado a pielonefritis), promoviendo la unión de las bacterias portadoras a los receptores de glucoesfingolípidos que contienen el motivo Gal( $\alpha$ 1–4)Gal $\beta$ . Estos globósidos se encuentran presentes fundamentalmente en las células uroepiteliales y los eritrocitos humanos pertenecientes al grupo sanguíneo P<sup>9</sup> .

Éstos receptores presentan especificidad de huésped y son importantes en el tropismo de los microorganismos por ciertos huéspedes y tejidos. Las fimbrias P actúan en distintas fases de la infección, permitiendo una mayor permanencia en el tracto digestivo, y una más eficaz diseminación al tracto urinario.

El clúster pertenece al conjunto de adhesinas que se ensamblan bajo el sistema chaperona/usher y se encuentra compuesto por 11 o 12 genes. Seis estructurales, tres relacionados al sistema de transporte y ensamblaje y dos o tres reguladores (ver figura 1). Los genes relacionados al transporte y ensamblaje son *papC* (que codifica para PapC), una proteína de membrana externa (que cumple funciones de usher o “acomodador”) responsable de la traslocación de las sub unidades de la fimbria a través de la membrana externa, mientras que *papD* y *papJ* (codificantes de PapD y PapJ) dos proteínas con función de chaperona, que facilita el plegamiento de las subunidades del pili durante el transporte.

Básicamente, desde el punto de vista estructural, la fimbria esta compuesta por una fibra relativamente rígida y sin funciones de adherencia constituida por aproximadamente 1000 copias de PapA y una unidad mínima con actividad de adherencia compuesta por el complejo K,E,F-G.

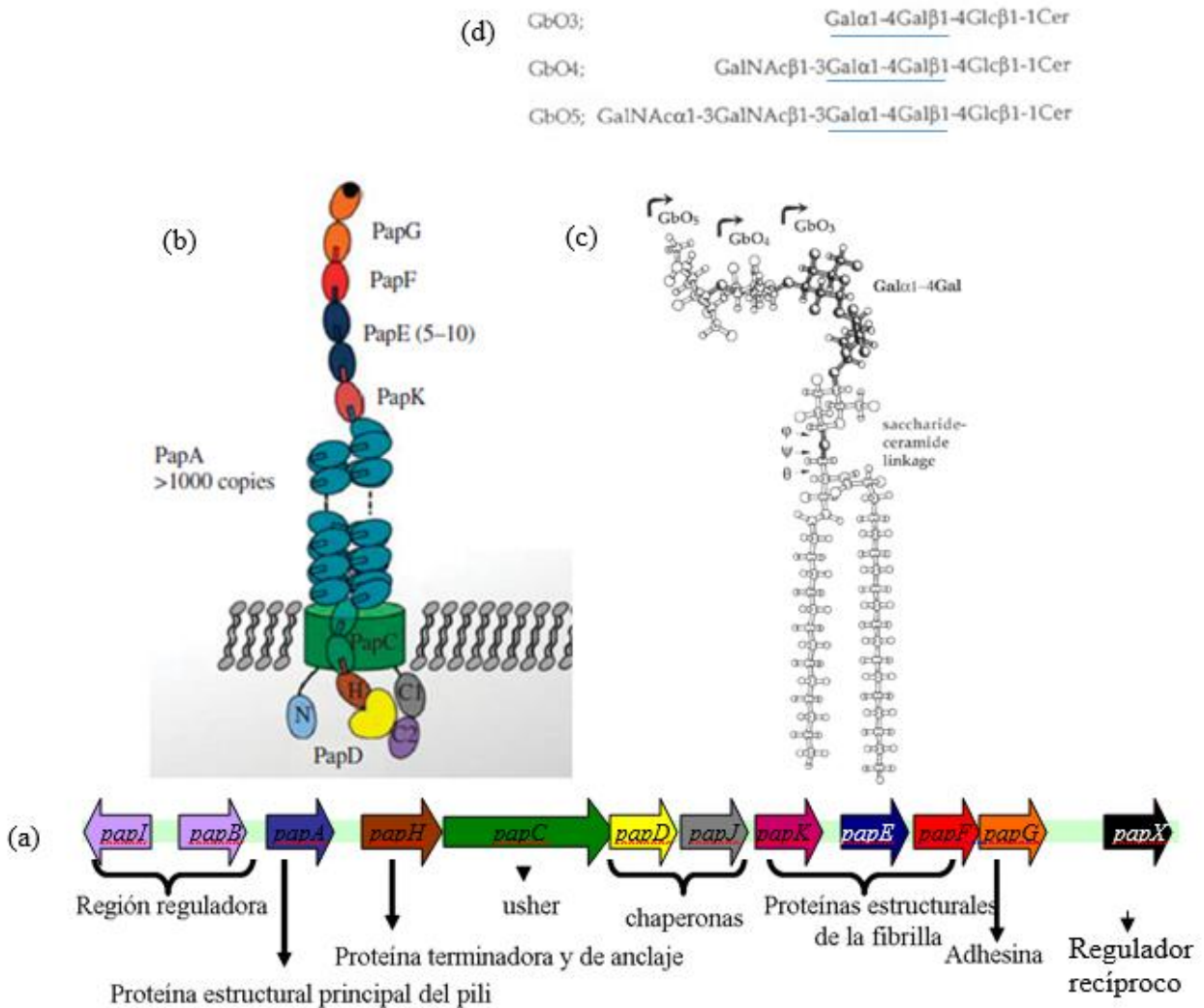


Figura 1. Esquema de las distintas estructuras involucradas en la interacción de la fimbria P y los distintos globósidos que contienen el receptor Gal(α1-4)Galβ. (a) estructura de un cluster de los genes *pap* (ver más explicación en el texto); (b) modelo de la organización del pili P, mostrando la ubicación de las diferentes sub unidades proteicas; (c) modelo de bolas y varillas de la estructura del receptor glicosfingolípido que contiene al disacárido Gal(α1-4)Galβ, donde se señala el comienzo de los globósidos GbO<sub>3</sub>, GbO<sub>4</sub> y GbO<sub>5</sub> (ver más explicación en el texto); (d) estructura química de los globósidos donde se encuentra subrayada la posición del disacárido Gal(α1-4)Galβ figura compuesta y adaptada a partir de las propuestas por Busch & Waksman y Stromberg y cols.<sup>10,11</sup>

Dentro de este complejo, K, E y F conforman una fibrilla delgada y flexible y PapG contiene el sitio de unión al disacárido Gal-Gal. Pap G muestran variaciones antigénicas, originando 3 variantes moleculares que se denominan alelos I, II y III. Si bien en los tres casos el receptor sigue siendo el disacárido de galactosa, lo que cambia es la afinidad por un receptor u otro dependiendo de la posición del motivo Gal( $\alpha$ 1-4)Gal $\beta$  dentro del glicosfingolípido.

Así PapGII (que es el alelo más frecuente hallado en aislamientos humanos) se une al globósido GbO4 presente en el urotelio renal, PapGIII se une al antígeno de Forssman o GbO5 mientras que PapGI es excepcional encontrarlo en humanos (ver figura 1).<sup>11, 12</sup>

La fimbria P presenta variación de fase mediada por metilación de dos sitios blanco de la deoxi-adenosin metiltransferasa (Dam) y la acción de la proteína reguladora sensible a Leucina (Lrp) a nivel de la región reguladora (ver figura 1).

Recientemente se ha reportado un sistema de co regulación entre las distintas adhesinas y los flagelos bacterianos mediados por la proteína PapX<sup>13, 14</sup>. El gen *papX* sería el duodécimo gen de uno de los operones *pap* y regularía en menos no sola la expresión de otras adhesinas como la fimbria tipo 1 sino también la movilidad bacteriana por inhibición de la síntesis del flagelo. Genes codificantes de proteínas homólogas a PapX se encuentran en varios operones relacionados a fimbrias, como ser las fimbrias Sfa/F1C<sup>14</sup>.

#### 2.II.A.a.ii\_Fimbrias afa/Dr:

Las fimbrias AFA/Dr constituyen una amplia familia de adhesinas que se unen a receptores humanos y/o animales.<sup>15</sup>

Al igual que la fimbria P, es exportada por el sistema Chaperon Usher, sin embargo, el operón se encuentra constituido básicamente por 5 genes denominados de la A a la E (ver figura 2). La estructura de la fimbria está compuesta fundamentalmente por sub unidades repetidas de AfaE/DraE y una copia terminal de AfaD/DraD (ver figura 2).

Si bien el nombre Afa deriva de AFimbrial adhesin, se sabe que hay variantes que presentan delgadas estructuras fimbriales<sup>16, 17</sup>.

Estas adhesinas se unen a varios receptores como ser el Factor acelerador de degradación (Decay Accelerating Factor-DAF), el colágeno tipo IV y a moléculas de antígeno carcinoembrionario relacionado a adhesión celular (CEACAMs).<sup>15</sup>



La presencia de las fimbrias Afa/Dr se han asociado a casos de infecciones urinarias recurrentes<sup>15</sup> lo cual podría estar relacionado a la capacidad de estas de actuar también como invasinas promoviendo la internalización en células eucariotas a través de su unión a DAF y CEACAMs y las integrinas  $\alpha 5\beta 1$ <sup>18</sup>.

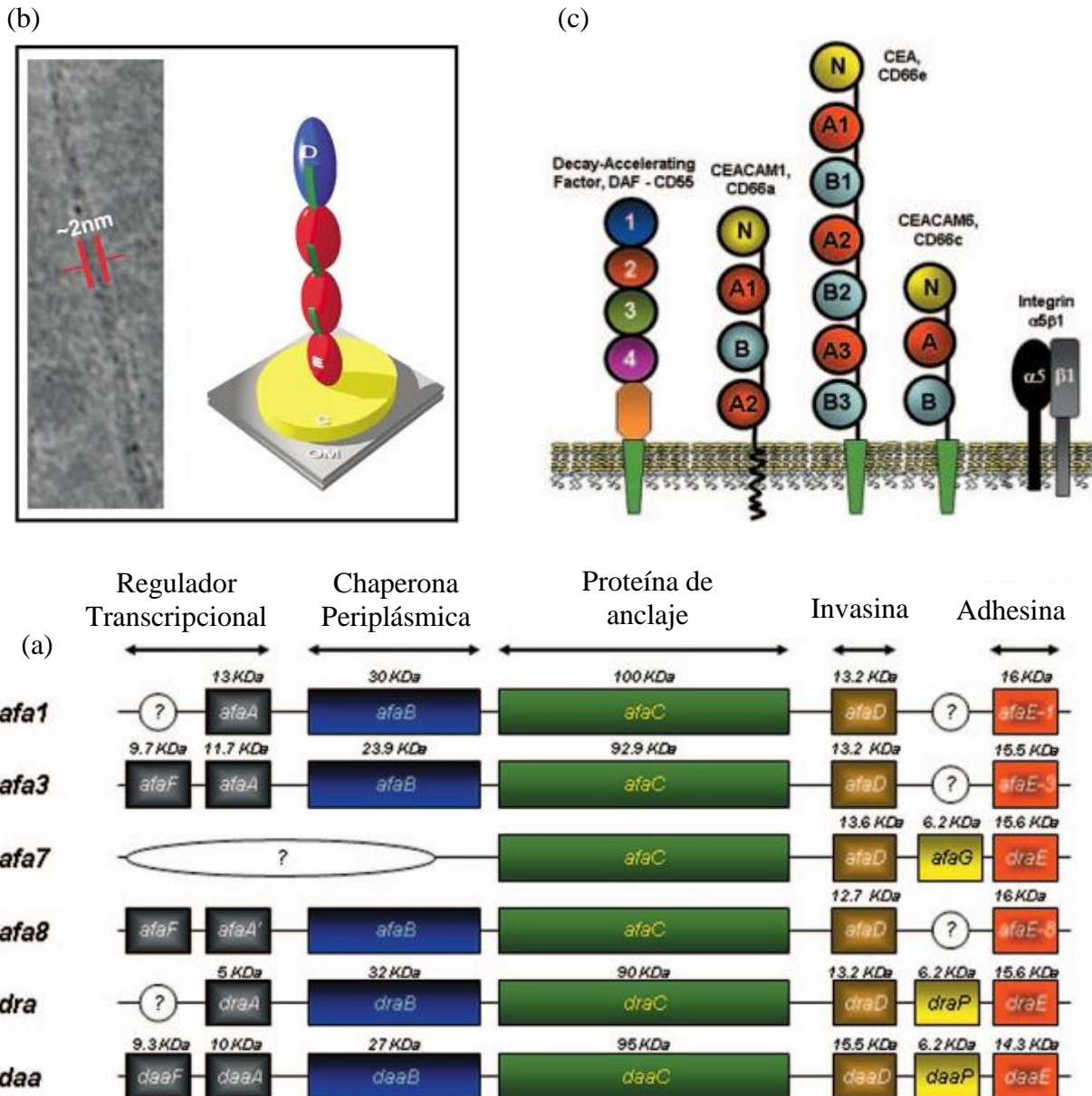


Figura 2: Estructura de la familia de adhesinas Afa/Dr y sus receptores. a) Esquema de operones de diferentes adhesinas Afa y Dr. Sobre las cajas que representan los genes se señala la función de la proteína codificada. b) Foto de microscopía electrónica de una fimbria Afa/Dr y su representación esquemática, en amarillo AfaC, en rojo AfaE y en azul AfaD. c) Esquema de los diferentes receptores de las adhesinas Afa/Dr. Tomada y adaptada de Anderson KL y colaboradores y Servin<sup>19 15</sup>

### 2.II.A.a.iii\_Fimbrias S/F1C

Las fimbrias S y F1C constituyen un sistema de adhesinas estrechamente relacionados codificadas por los genes *sfa* y *foc*.<sup>20</sup>



Si bien presentan una alta similitud en la estructura de los operones así como en la identidad de los genes que codifican sus proteínas, presentan diferencias tanto en los receptores reconocidos como en las propiedades conferidas por dichas fimbrias<sup>20, 21</sup>.

Así la fimbria S interactúa con receptores que presentan la molécula  $\alpha$  sialyl-(2-3)- $\beta$ -lactosa, es capaz de aglutinar eritrocitos, y su presencia se asocia a aislamientos obtenidos no solo de infecciones del tracto urinario, sino también de sepsis y meningitis en el recién nacido<sup>8</sup>.

Por su parte, la fimbria F1C no aglutina eritrocitos, se une a receptores que contiene  $\beta$ -GalNac-1,4- $\beta$ -Gal están relacionadas con la formación de biofilm y aislamientos causantes de infección del tracto urinario<sup>22, 23</sup>.

La expresión de las fimbrias S y F1C están doblemente reguladas, por un lado mediante variación de fase y por otro por la acción de los productos de genes reguladores (*sfaX/focX*) ubicados en el mismo operón. Estos genes corresponden a reguladores transcripcionales de tipo LysR con función similar a la mencionada para *papX*<sup>14</sup>.

## 2.II.A.b\_ Fimbrias manosa sensibles:

### 2.II.A.b.i\_ Fimbrias tipo 1:

El prototipo son las fimbrias tipo 1, (codificadas por los genes *fim*) las cuales se unen a epítopes de manosa de glicoproteínas secretadas, como IgA secretora y moco urinario, proteína de Tamm-Horsfall, uroplaquina de la vejiga y a la fibronectina<sup>24</sup>. Casi todas las cepas de *E. coli* que causan cistitis expresan la fimbria tipo 1, no así las que producen pielonefritis. La regulación de la expresión de estos genes durante la infección se encuentra bajo control de un promotor capaz de realizar variación de fase (modelo tipo on/off) dependiente de la acción de las recombinasas FimB y FimE<sup>25</sup>. Este hecho podría ser un atributo de virulencia en sí mismo, ya que se ha demostrado que mutantes que expresan en forma permanente estas fimbrias son menos aptas para producir infección, que las cepas salvajes que pueden transitoriamente no expresarla<sup>24</sup>. Estas fimbrias se unen a la uroplaquina de las células superficiales del urotelio conduciendo a su exfoliación, favoreciendo así la invasión de capas celulares más profundas<sup>24</sup>.

La producción de las fimbrias tipo 1 también ha sido relacionada a la invasión de células uroteliales por un mecanismo que involucra el reordenamiento de los filamentos de actina del citoesqueleto<sup>26</sup>

La capacidad de las proteínas Pap, de producir una gran respuesta inflamatoria en conjunto con la presencia de adhesinas relacionadas a invasión celular como fimbria tipo 1, S o Dr han sido asociada a cepas de *E. coli* con mayor riesgo de producir bacteriemias a punto de partida urinario<sup>27</sup>.

## 2.II.B\_ Moléculas que producen daño en el huésped

### 2.II.B.a\_ $\alpha$ hemolisina:

Se trata de una toxina de la familia de proteínas RTX (por repeats in toxin). La familia RTX está constituida por un conjunto de proteínas que son secretadas por sistema de secreción tipo 1 (SST1) y que deben su nombre a la presencia de repeticiones de secuencias ricas en glicina y aspartato en el extremo carboxi terminal de la proteína. Estas repeticiones a su vez, les confiere a estas toxinas múltiples sitios de unión al ión  $\text{Ca}^{++28}$ .

El determinante genético de HlyA es el operón *hlyCABD* (fig. 3) donde *hlyA* codifica para la hemolisina propiamente dicha, la cual se sintetiza como pro toxina inactiva, *hlyC* codifica para una enzima con actividad acetil transferasa que activa a nivel postraduccional la proteína HlyA por el agregado de dos residuos de ácidos grasos y *hlyB* y *hlyD* codifican para parte del SST1. HlyB es un transportador de tipo casete de unión al ATP (ABC por ATP binding cassette) y HlyD es una proteína de fusión de membranas que comunica HlyB con TolC una porina de membrana externa ampliamente distribuida en *E. coli* y cuyo gen no está relacionado al operón *hlyCABD*<sup>29</sup>.

Alternativamente, HlyA puede exportarse asociada a vesículas de membrana externa, habiéndose propuesto que este mecanismo sería más eficiente en relación a la actividad lítica de la toxina<sup>30</sup>

Una vez sintetizada, activada y exportada, HlyA adquiere su plegamiento final por un proceso que involucra la unión al ión  $\text{Ca}^{++}$  presente a altas concentraciones a nivel extracelular y la interacción con los residuos de ácidos grasos de la propia toxina<sup>29, 31</sup>.

Si bien se la considera típicamente como una hemolisina, el poder citolítico de la toxina se extiende además de a eritrocitos, a fibroblastos embrionarios y adultos, granulocitos, linfocitos y macrófagos e incluso liposomas libres de proteínas<sup>29</sup>.

El mecanismo de acción de HlyA involucra al menos tres etapas, la unión reversible de la proteína a la membrana mediada por el dominio de unión a glicoforina, la inserción de la toxina en la membrana lipídica a través del dominio de inserción y finalmente la

oligomerización de las unidades y la conformación de los poros, para lo cual juega un papel fundamental los residuos de ácidos grasos<sup>29</sup> (ver figura 3).

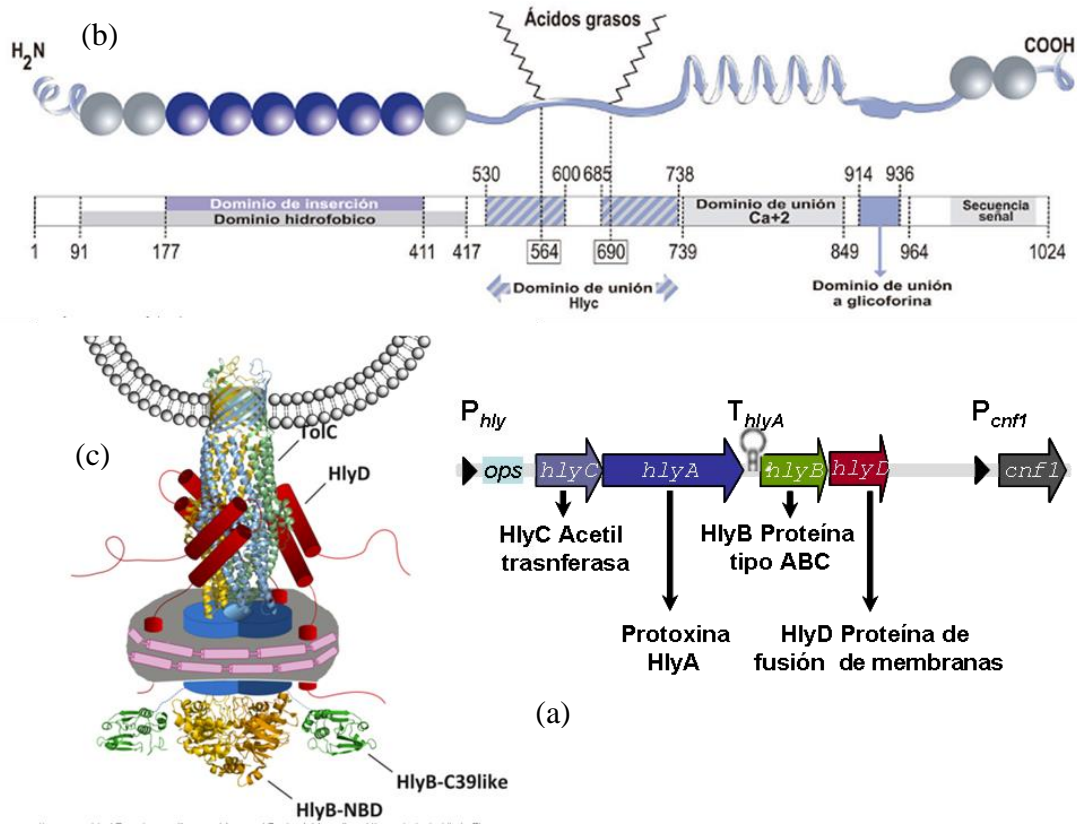


Figura 3: Representación del operón *hlyCABD* + *cnf1* y sus mecanismos reguladores (a), de la estructura monomérica de HlyA (b) y del polímero ensamblado interactuando con la membrana celular del huésped y todo el sistema de transporte (c) ver explicación en el texto correspondiente a HlyA y CNF-1. Tomado y modificado de Bakás L y cols. Lemonnier M y cols. <sup>29,32</sup> y <http://www.biochemistry1.hhu.de/unsere-forschung/ag-schmitt/type-1-secretion-system.html>

La cantidad de unidades de  $\alpha$ -hemolisina que participa en la oligomerización es dependiente de la dosis y determina el tamaño de los poros que se forman.<sup>29</sup>

### 2.II.B.b\_Factor necrosante de toxicidad tipo 1 (CNF-1):

CNF-1 forma parte de las toxinas de tipo A/B y se encuentra codificado en la Isla de Patogenicidad II (PAI-II) de cepas de UPEC corriente abajo del operón *hlyCABD* (ver figura 3)<sup>32, 33</sup>.

La expresión de CNF-1 se encuentra acoplada a la de todo el operón *hlyCABD*, proceso que se regula a nivel de una región denominada *ops* (operon polarity supresor) por la acción de la proteína RfaH (ver figura 3)<sup>32, 33</sup>. La interacción RfaH/*ops* evitaría la

formación de un terminador ubicado entre los genes *hlyA* y *hlyB* (ver figura 3) lo que generaría una molécula de RNAm que incluiría todo *hlyCABD*, *cnf1* y la región intergénica entre ambos<sup>33</sup>.

Una vez expresada, CNF-1 sería exportada asociada a la liberación de vesículas de membrana externa al igual que HlyA<sup>34</sup>.

CNF-1 consiste en una toxina monomérica con tres dominios. El extremo aminoterminal es el responsable de la unión al receptor celular, el cual puede ser o bien una proteína precursora del receptor de laminina o el propio receptor maduro de laminina. El extremo carboxiterminal posee la actividad GTPasa responsable de la acción de CNF-1 (ver más abajo), a la vez que presentaría un segundo sitio de unión a receptores, que se ha sugerido podría unirse a proteoglicanos de heparán sulfato<sup>35</sup>. El tercer dominio se encuentra entre los dos anteriores y contiene dos hélices hidrofóbicas que participarían en la liberación de la toxina en las etapas iniciales de la formación de la vesícula endosomal en un proceso mediado por la exposición a pH ácido<sup>36, 37</sup>.

El efecto de la acción de CNF-1 es la activación transitoria de las Rho GTPasas: RhoA, Rac1 and Cdc42, las cuales son responsables de la reorganización de los microfilamentos de actina y los microtúbulos del citoesqueleto en los procesos de adhesión, diferenciación y polarización durante la migración<sup>32</sup>.

La activación de las Rho GTPasas se da por acción directa de CNF-1 que produce la deamidación de la glutamina 63 en ácido glutámico (para el caso de RhoA) o de la glutamina 61 para Rac1 y Cdc42. En esta instancia se produce re arreglo de los filamentos de actina que pueden observarse como fibras de stress, ondulaciones de la membrana o lamelipodios y filopodios, dependiendo que se activen RhoA, Rac1 o Cdc42 respectivamente, como se ve en la figura 4<sup>32</sup>.

La permanencia en el tiempo de CNF1 en el citosol promueve la poliubiquitinación de las Rho GTPasas y con ello, la degradación de las mismas por parte del proteosoma.

La depleción de estas proteínas genera destrucción de las uniones intercelulares y migración celular<sup>38</sup>.

La suma de estos efectos promueve la invasión de la célula huésped por parte de los microorganismos portadores de CNF-1<sup>36</sup>.

Este efecto se ha visto directamente en células de vejiga<sup>36, 38</sup> pero también en células endoteliales de la microcirculación de la barrera hematoencefálica, lo que apoyaría la hipótesis de que CNF-1 es importante en la producción de meningitis<sup>39</sup>.

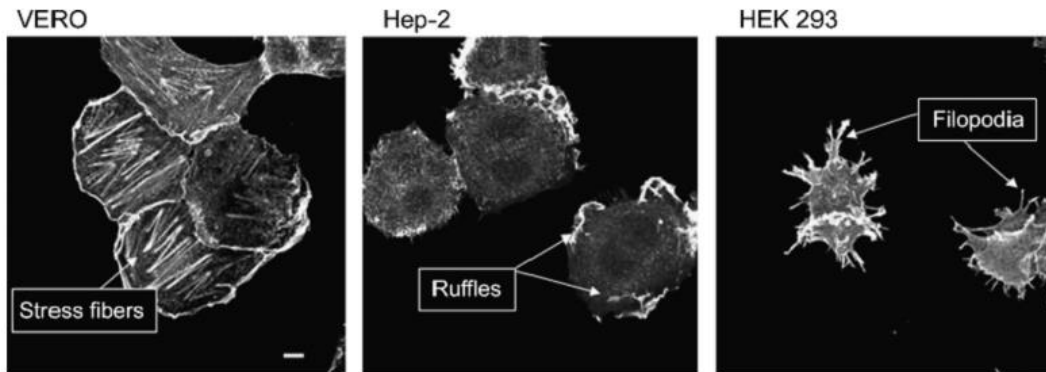


Figura 4: Reorganización de los filamentos de actina inducidos por CNF1 en diferentes líneas celulares, se observan fibras de stress en células Vero, ondulaciones de membrana en células Hep-2 y filopodios en HEK 293. Figura tomada de Lemonnier M y cols<sup>32</sup>.

## 2.II.C\_Factores que favorecen la sobrevivencia del microorganismo durante la infección:

### 2.II.C.a\_Sistemas de adquisición de hierro:

El hierro es un nutriente esencial para la vida de los seres vivos, participando en múltiples procesos metabólicos. Así forma parte de los grupos prostéticos de proteínas, interviene en el transporte de oxígeno, en la replicación del ADN y como par redox  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  en diversas reacciones que incluye la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria y reacciones de protección contra especies reactivas de oxígeno<sup>40, 41</sup>.

La forma soluble es  $Fe^{2+}$ , sin embargo, es altamente tóxica para las células ya que genera la producción de radicales libres de oxígeno. Por este motivo, en los seres vivos, la principal forma es como ion férrico ( $Fe^{3+}$ ) y se encuentra en su mayoría unido a proteínas ya sea las hemoproteínas como la hemoglobina o proteínas de almacenaje ya sea intracelular (ferritina) o a nivel plasmático (transferrina)<sup>41</sup>.

Por este motivo, la supervivencia de las bacterias patógenas cuando están produciendo una infección, depende en buena forma de la capacidad que presenten para secuestrar  $Fe^{+2}$  existente, de un modo más eficiente que el propio huésped.

La captación de hierro puede realizarse por contacto directo o indirecto con la fuente del ión<sup>41</sup>. En el primer caso, se trata de receptores de membrana que son capaces de directamente internalizar moléculas portadoras de hierro como el grupo hemo y los

receptores *shuA* y *chuA*<sup>42</sup>. En el segundo caso, se liberan pequeñas moléculas que presentan alta afinidad por el hierro denominadas sideróforos, a los cuáles es transferido el hierro, para luego ser captado por el microorganismo productor. Estos sideróforos presentan mayor afinidad que las proteínas almacenadoras de hierro del huésped, lo cual permite la transferencia del hierro hacia ellos.

Cada sideróforo unido a hierro (ferri-sideróforo) se une a un receptor específico de membrana externa (ver figura 5).

La captación del sideróforo o internalización se realiza en dos pasos:

En una primera instancia el acceso al espacio periplásmico por acoplamiento del complejo ferri-sideróforo-receptor a un sistema TonB, ExbD, ExbB que acopla la energía protónmotiz de la membrana interna al proceso activo del ingreso del hierro.

El segundo involucra la transferencia del ferri-sideróforo desde el receptor a un sistema de transporte de membrana interna dependiente de ATP.

La última etapa es la liberación del hierro. A excepción de la separación de la ferri-enterobactina que se realiza mediante degradación enzimática, la liberación de hierro se realiza por reducción del hierro unido a sideróforo de su forma férrica a ferrosa, la que se libera automáticamente.

Se describen cinco clases de sideróforos: catecolatos, fenolatos, hidroxamatos, hidroxicarboxilatos y mixtos<sup>40</sup>.

En general los genes para la síntesis, exportación, re captación y liberación del hierro del sideróforo a nivel citoplasmático se encuentran agrupados en clusters, como se muestra en la figura 5<sup>40</sup>.

Los catecolatos están representados por enterobactina y salmoquelina. El primero, es un sideróforo que se encuentra ampliamente distribuido en cepas patógenas y no patógenas de *E. coli*, así como en otras enterobacterias. Sin embargo, éste no sería un factor de virulencia particularmente útil ya que se ha demostrado que la lipocalina 2, un marcador de respuesta del sistema inmune innato, ejerce un fuerte efecto bacteriostático por unión y secuestro de enterobactina en aquellas cepas que solo pueden captar hierro por este sistema<sup>43, 44</sup>.



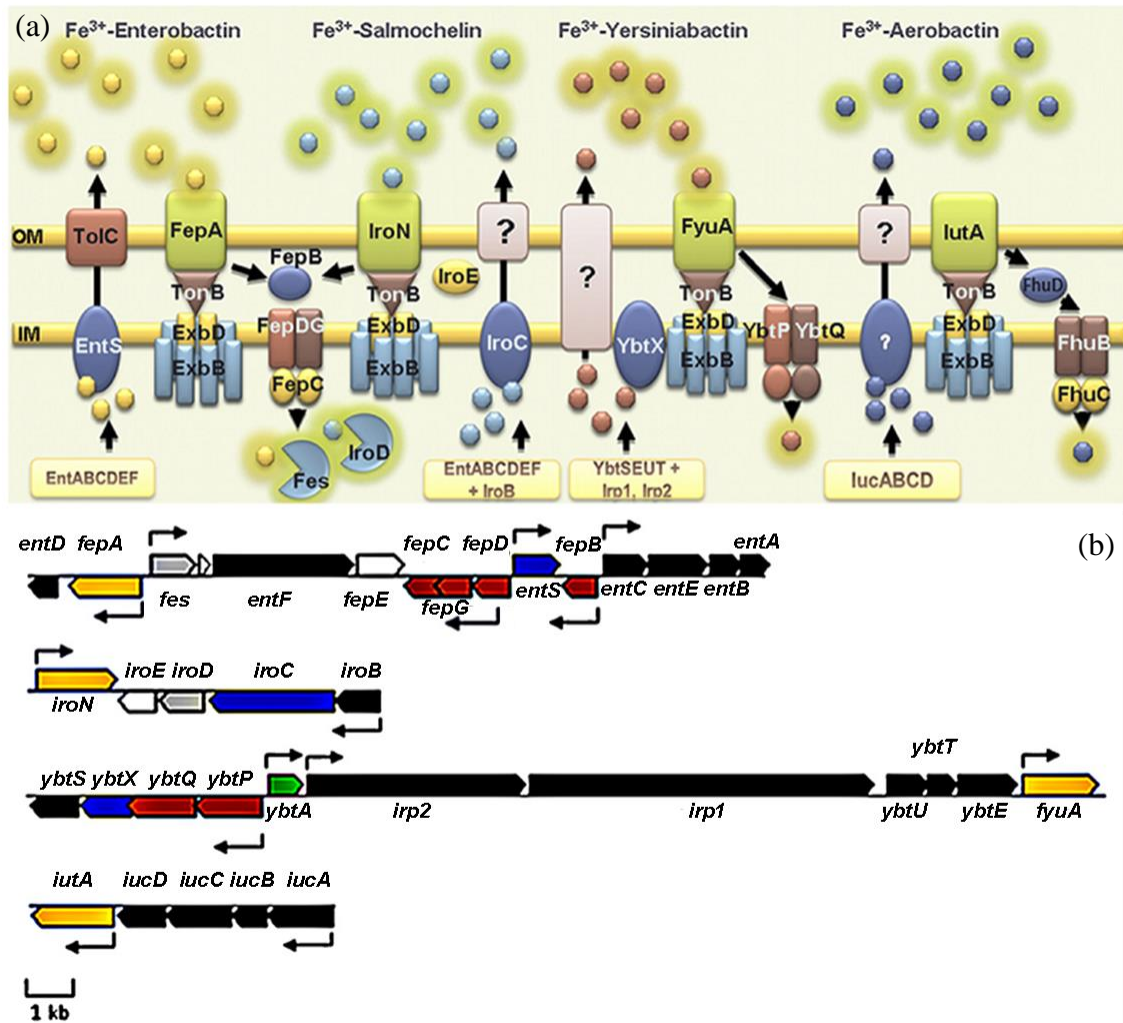


Figura 5: Modelo de los diferentes sistemas de sideróforos: Panel (a) Las proteínas involucradas en la síntesis de los cuatro tipos de sideróforos se muestran en rectángulos amarillos. Las proteínas intramembranales responsables de la exportación se muestran en azul oscuro; los receptores de membrana externa en verde, asociados a los complejos TonB/ExbD requeridos para la transducción de energía y correspondiente internalización de los sideróforos al espacio periplásmico. Los transportadores ABC (ATP binding cassette) se ven en la membrana interna y las esterases responsables de la degradación de los catecolatos para la liberación del hierro se representan a nivel citoplasmático (ver más explicación en el texto). Panel (b): se muestran los clusters de genes codificantes de los productos requeridos para la biosíntesis (en negro), exportación (azul) recepción (amarillo), importación (marrón) y degradación (gris) de los sideróforos. Tomado y modificado de Garénaux A y cols.<sup>40</sup>

Salmoquelina es la variante glicosilada de enterobactina y como tal no se une a la lipocalina 2. La glucosiltransferasa que media esta reacción está codificada por el gen *iroB*, mientras que los genes *iroC*, *iroD*, *iroE* e *iroN* codifican para un transportador de tipo ABC necesario para el transporte de salmoquelina, una esterasa citoplasmática, una hidrolasa periplásmica y el receptor de membrana externa del sideróforo (ver figura 5)<sup>40</sup>.

Los productos de *iroB*, *iroC*, *iroD* e *iroN* serían los más importantes en la virulencia conferida por salmoquelina<sup>45</sup>. La proteína IroN estaría relacionada también a invasión celular<sup>46</sup>.

Yesiniobactina es un sideróforo del grupo de los fenolatos cuyo receptor es FyuA. Los determinantes genéticos y el modelo de síntesis exportación y re captación pueden verse en la figura 5<sup>40</sup>.

Finalmente aerobactina es un sideróforo mixto citrato-hidroxamato cuyo receptor de membrana es IutA.

Adicionalmente, a su función como captadores de hierro, los sideróforos han sido relacionados a virulencia por presentar actividad antioxidante y unirse a metales pesados como el mercurio, impidiendo su efecto tóxico<sup>47-50</sup>

## 2.II.C.b\_Cápsula:

La cápsula forma parte de los exopolisacáridos bacterianos conjuntamente con el antígeno O del LPS y el ácido colánico entre otros, compartiendo en algunos casos la misma ruta biosintética<sup>51, 52</sup>.

De acuerdo a la clasificación de Whitfield y Roberts se reconocen cuatro tipos capsulares en *E. coli*, en base a sus determinantes genéticos y su mecanismo de síntesis<sup>51</sup>.

Los tipos I y IV estarían relacionados a la vía biosintética del antígeno O del LPS y el ácido colánico y producen una cápsula delgada y con poca densidad de carga negativa<sup>51, 52</sup>.

Los grupos II y III son los que más se asocian a patología en animales, siendo los tipos capsulares K1 y K5 dentro del grupo II, los más ampliamente asociados a infecciones en humanos<sup>53, 54</sup>.

La organización genética de ambos tipos capsulares es muy similar, encontrándose los genes de la síntesis y el transporte de la cápsula agrupados en un cluster *kps* que clásicamente se divide en tres regiones como se ve en la figura 6.

La región 1 y 3 son relativamente constantes para todos los serotipos del grupo II y corresponde a los genes de transferencia desde el citoplasma al exterior celular. Por su parte la región 2 es de tamaño variable y es específica de serotipo.



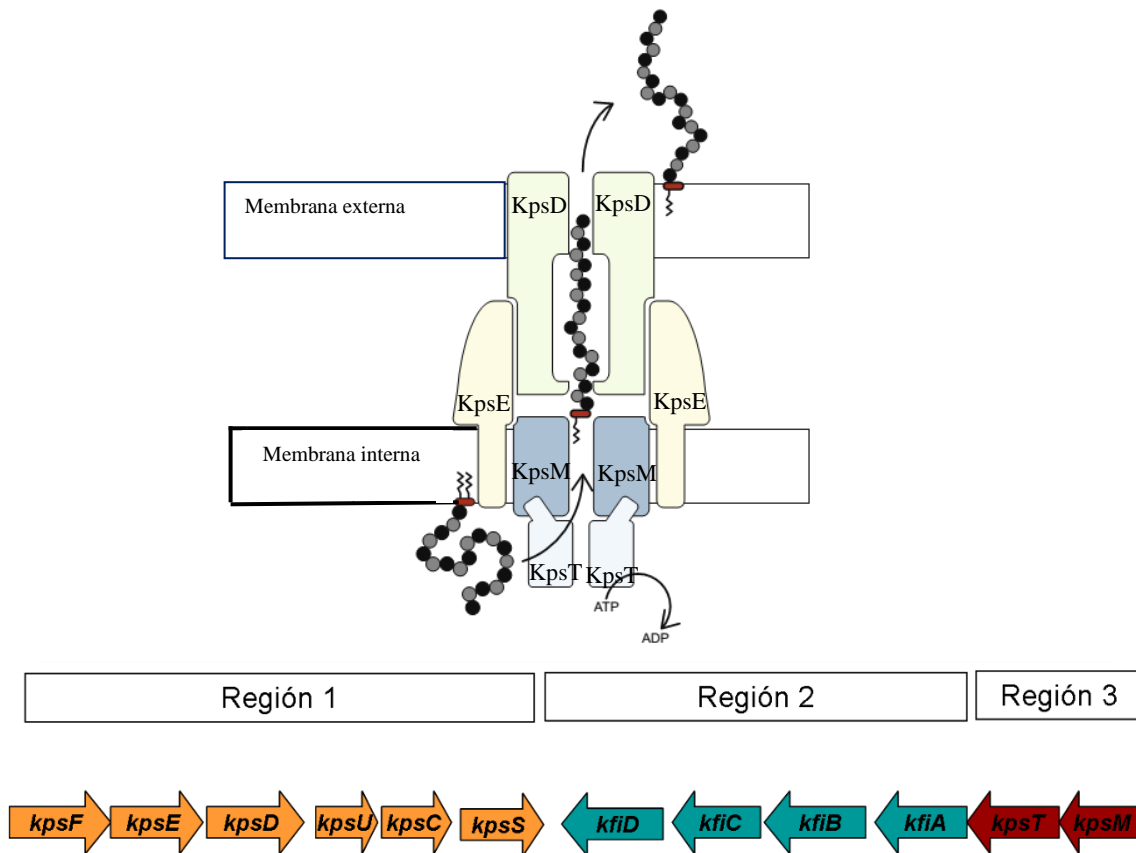


Figura 6: Organización genética (a) y modelo de la maquinaria de exportación (b) de la síntesis de cápsula de grupo II: Mientras que las regiones 1 y 3 son conservadas en todas las cápsulas del grupo II, la región 2 es única para cada serotipo. Los seis genes de la región 1 se organizan en una única unidad transcripcional y las proteínas codificadas se encargan de: KpsE y D translocación del polímero desde el periplasma a través de la membrana externa. KpsF, U, C y S son enzimas q participan en la síntesis del polímero del ácido 2 ceto 3 desoxioctanoico (KDO). KpsT y M conforman el sistema de exportación del polímero desde el citoplasma al espacio periplásmico. Tomada y adaptada de Whitfield & Roberts y Willis & Whitfield <sup>51, 55</sup>.

En esta región se encuentran los genes que codifican para aquellas enzimas que realizan los enlaces glucosídicos, así como las enzimas que sintetizan aquellos azúcares que no son producidos por el microorganismo en otras vías metabólicas <sup>51, 52</sup>

Esta región, a diferencia de la 1 y la 3 del cluster, posee un contenido A+T mayor que el del resto del cromosoma de *E.coli*, lo cuál soporta la hipótesis de que esta zona podría adquirirse por recombinación homóloga<sup>52</sup>

### **Caracterización de ExPEC:**

Como ya se mencionó antes, la presencia de un conjunto variable de estos atributos de virulencia ha llevado a diferenciar las clonas de ExPEC de aquellas comensales del tracto gastrointestinal. Una primera aproximación para diferenciar patógenos de comensales es la determinación de GF. En 1990 Herzer et al.<sup>56</sup> describe en base a multilocus enzimático el agrupamiento de 72 cepas de *E. coli* en cuatro GF denominados A, B1, B2 y D. Las cepas patógenas extra intestinales de *E. coli* pertenecen filogenéticamente al grupo B2 (y en menos medida al grupo D)<sup>6, 57, 58</sup> mientras que las cepas de *E. coli* que forman parte de la microbiota intestinal pertenecen al grupo filogenético A y B1. En el año 2000 Clermont y cols. describen una multiplex PCR con buena correlación con el multilocus enzimático<sup>59</sup>. Por otro lado, en el año 2003 Johnson y cols. establecen un escore para definir ExPEC en base a la detección de dos o más de los seis genes de virulencia *papA* y *papC*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA*, *kpsM II*<sup>57</sup>. La presencia de estos genes se relaciona a su vez con la pertenencia de dichas cepas a los grupos filogenéticos B2 y D (relacionado a ExPEC) y menos frecuentemente a los grupos A y B1.<sup>59</sup>

Para el tratamiento de las infecciones causadas por *E. coli*, puede recurrirse a una amplia gama de antibióticos activos sobre este microorganismo, siendo las quinolonas y los betalactámicos los más frecuentemente utilizados inclusive en nuestro país<sup>60-62</sup>.

A continuación, se describirán brevemente estos grupos de antibióticos, así como sus principales mecanismos de resistencia.

## 2.III.Antibióticos $\beta$ -lactámicos

El primer antibiótico de esta clase, la penicilina, fue descubierto en 1928 por Alexander Fleming mientras estudiaba cultivos del género *Staphylococcus* y era producida por una especie no caracterizada hasta el momento de *Penicillium*<sup>63</sup>.

Si bien se realizaron algunos ensayos preliminares <sup>64</sup> no fue hasta el año 1940 que se consigue purificar la penicilina, lo que permitió realizar los primeros trabajos en ratón y en humanos con el antibiótico purificado <sup>65, 66</sup>.

Desde ese momento, la familia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos como producto natural, semi sintético o en asociación a inhibidores no ha parado de crecer <sup>67, 68</sup>.

### 2.III.A\_Estructura química:

De acuerdo a su estructura química, pueden describirse cuatro clases de  $\beta$ -lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemes (ver figura 7). La generación de un número creciente de sub clases, dentro de las dos primeras, hace que sean los grupos más grandes dentro de la familia.

Las penicilinas tienen como núcleo base al ácido 6-aminopenicilánico o grupo penam, el cual está compuesto por la fusión del anillo  $\beta$ -lactámico (común a toda la familia) y un anillo tiazolidínico (ver figura 7). Las sustituciones en la cadena lateral del C6 permite modificar el espectro de acción y las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de estos compuestos<sup>69</sup>.

El núcleo base de las cefalosporinas es el ácido 7 $\alpha$ -cefalosporánico o grupo cefem, el cual queda constituido por la fusión del anillo  $\beta$ -lactámico a un anillo dihidrotiacínico. Se generan así compuestos de 8 miembros pudiéndose introducir cadenas laterales en las posiciones 3 y 7 (ver figura 7). Estas cambian las características de las moléculas en lo que tienen que ver con sus propiedades farmacocinéticas, farmacodinámicas (fundamentalmente en C3), espectro de acción y estabilidad ante determinadas enzimas inactivantes de  $\beta$ -lactámicos denominadas  $\beta$ -lactamasas (principalmente relacionado a C7)<sup>70</sup>.

Los carbapenemes fusionan el anillo  $\beta$ -lactámico a un anillo pirrolidínico, que se diferencia del anillo tiazolidínico de las penicilinas fundamentalmente en tres características: se trata de un anillo insaturado que permite el agregado de cadenas laterales en C1 y C2; presenta un grupo metileno en lugar del grupo sulfuro en la posición 1 y contiene un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 (ver figura 7). Se trata de los  $\beta$ -lactámicos más estables ante la presencia de  $\beta$ -lactamasas y con mayor espectro antimicrobiano dentro de la familia <sup>71</sup>.

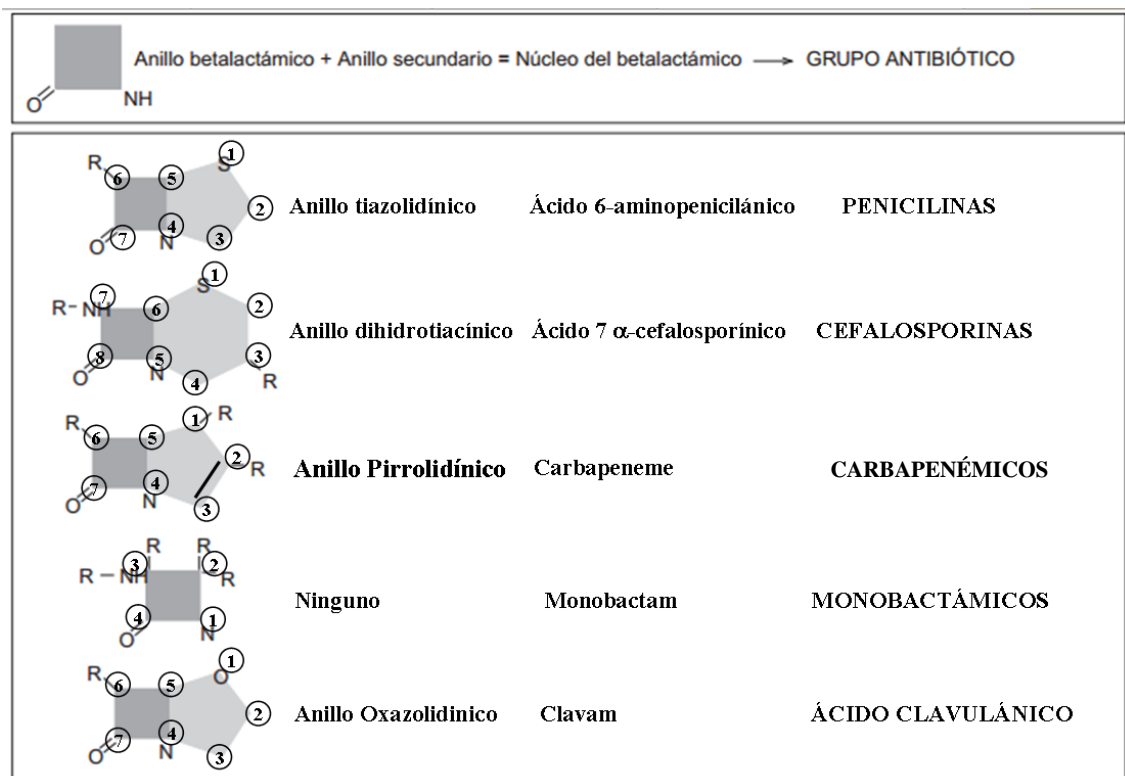


Figura 7: Estructura química de los diferentes antibióticos  $\beta$ -lactámicos tomada y modificada de Suárez & Guidol <sup>62</sup>.

Finalmente, los monobactámicos consisten solamente en el anillo  $\beta$ -lactámico, y tienen como característica distintiva su alta estabilidad frente a las metalo  $\beta$ -lactamasas, un grupo particular de carbapenemás as (ver más adelante). El aztreonam es el único antibiótico disponible.<sup>71</sup>

## 2.III.B\_Sitio blanco “El Peptidoglicano”:

Los  $\beta$ -lactámicos ejercen su efecto por inhibición de la síntesis del peptidoglicano o mureína, actuando sobre las etapas finales de la misma.

Para comprender mejor esta acción se repasará brevemente el mecanismo de síntesis del peptidoglicano, el cuál es el componente fundamental de la pared celular tanto funcional como estructuralmente.

Dicha síntesis comprende tres etapas:

Una etapa citoplasmática, que comprende la síntesis de la molécula precursora y unidad estructural de la mureína compuesta por N-acetil glucosamina  $\beta$ 1-N-acetilmurámico pentapéptido (NAcGlc-NAcMur-penta).

Una etapa transmembrana, la cual culmina con la translocación de NacGlc-NacMur-penta desde el citoplasma hacia el espacio extracelular.

Una etapa extracelular, donde se produce el ensamblaje y maduración del peptidoglicano.

### 2.III.B.a\_Etapa citoplasmática:

El primer paso consiste en la síntesis de UDP-NAcMur a partir de UDP-NAcGlc, la cual ocurre por formación de un enol piruvato éster (a partir de fosfoenolpiruvato) y su reducción a lactil éter mediada por NADPH. Estas reacciones son llevadas a cabo por los productos de los genes de MurA y MurB.<sup>72</sup>

El siguiente paso es el agregado del componente peptídico de la mureína al grupo D-lactoyl del UDP-NAcMur para formar el UDP-NAcMur pentapéptido (UDP-NAcMur-penta).

En una primera etapa se agregan los tres primeros aminoácidos, para generar la forma UDP-NAcMur tripéptido (UDP-NAcMur tri). Este paso puede ocurrir por dos vías: A. por el agregado sucesivo de L-alanina, ácido D-glutámico y un diaminoácido relativamente variable que en general para Gram negativos es el ácido meso-diaminopimelico (meso-A<sub>2</sub>pm). B. por el agregado del tripéptido preformado, surgido en el proceso de reciclaje del péptidoglicano. En el primer caso el proceso está mediado por la acción sucesiva de las ligasas MurC, MurD y MurE, mientras que en el segundo se lleva a cabo por acción de la ligasa Mpl.

Sobre el UDP-NAcMur tri se agrega el di péptido D-alanil-D-alanina por acción de la ligasa MurF lo que da lugar al UDP-NAcMur-penta soluble <sup>72</sup>.

### 2.III.B.b\_Etapa transmembrana:

Esta etapa comienza con la transferencia del UDP-NAcMur-penta soluble, al lípido aceptor fosforilado undecaprenil fosfato por parte de la transferasa *MraY*<sup>73</sup>. Se forma así el denominado lípido I o undecaprenil-pirofosforil-UDP-NAcMur-penta. Finalmente, *MurG* le transfiere al lípido I una molécula de NAcGlc para formar el lípido II.

Si bien se desconoce exactamente el mecanismo de pasaje desde un lado de la membrana al otro, los últimos trabajos disponibles señalan a *FtsW* (una proteína transmembrana conservada en todas las bacterias que tienen peptidoglicano) como responsable de este paso<sup>74</sup>

### 2.III.B.c Etapa extracelular:

Es la etapa en que la mureína adquiere funcionalidad. El peptidoglicano a la vez que confiere protección osmótica debido a la alta osmolaridad intracelular también determina la forma de cada microorganismo. Como este proceso, además, debe acoplarse al crecimiento y división bacteriana, resulta necesario entender a la mureína como una macromolécula en permanente remodelación.

A los efectos de ponerle inicio a un proceso continuo, diremos que las primeras reacciones que deben ocurrir entonces son la formación de cadenas glicosídicas y el entrecruzamiento de las mismas. La enlongación de las cadenas glicosídicas se producen por la realización de enlaces  $\beta$ 1-4 entre moléculas de NAcGlc-NAcMur-penta mediante reacciones de trasnglicosilación asociados a membrana. El entrecruzamiento por su parte, involucra el componente peptídico del peptidoglicano e involucra reacciones de transpeptidación<sup>75</sup>. A las enzimas que actúan sobre esta etapa de síntesis y presentan actividad transglicosilasa y/o transpeptidasa se les denomina genéricamente peptidoglican sintetetasas. Dado que la actividad de transpeptidación es inhibida por  $\beta$ -lactámicos, estas enzimas reciben clásicamente el nombre de PBP (por penicillin binding proteins)<sup>76, 77</sup>.

Las PBP pueden dividirse en aquellas de alta más a molecular (AMM) y baja más a molecular (BMM)<sup>75</sup>. Las AMM son bifuncionales con un dominio conservado

transpeptidasa y un segundo dominio, ya sea con actividad transglicosilasa (AAM sub clase A) u otra actividad relacionada al mantenimiento y reciclaje del peptidoglicano (AAM sub clase B) <sup>75</sup>.

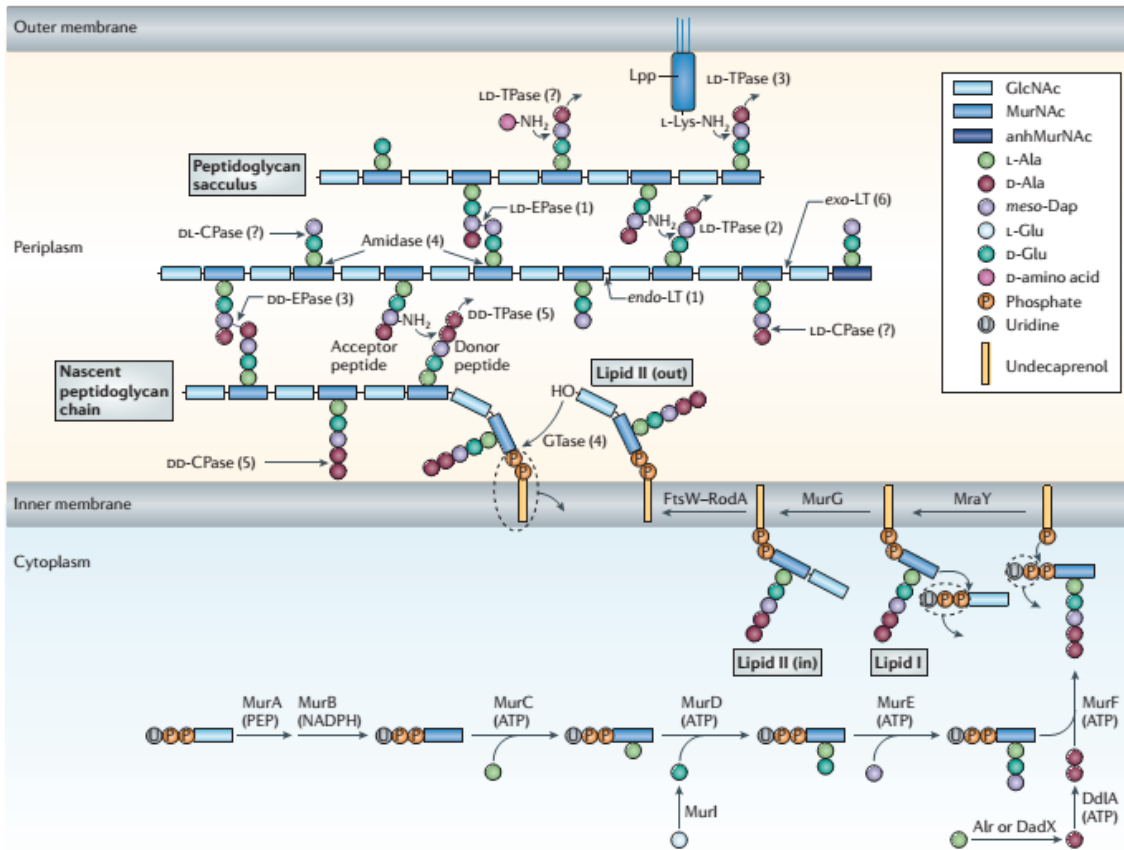


Figura 8: Esquema de la síntesis del peptidoglicano en bacilos gramnegativos, en sus etapas citoplásmica, intra membranal y periplásmica. Tomado de Typas y cols <sup>77</sup>.

Por su parte las BMM son monofuncionales y solo presentan actividad sobre el componente peptídico de la mureína. Estas reacciones en general implican el reconocimiento del di péptido D-alanil-D-alanina con la consiguiente ruptura del enlace peptídico y liberación de la última molécula de D-alanina. La transpeptidación acopla a la energía liberada por la ruptura del enlace peptídico, la formación de un nuevo enlace entre la D-alanina de la posición cuatro con el aminoácido presente en la posición tres de una cadena próxima. Las PBP de BMM pueden tener además función de carboxi peptidasa o endo peptidasa. En el primer caso se produce la eliminación de la última D-alanina en péptidos no entrecruzados de modo de impedir el entrecruzamiento de esa cadena. Las reacciones de endo peptidasas generan la ruptura del enlace peptídico existente entre dos cadenas glucosídicas. Estas reacciones estarían asociadas a la degradación del peptidoglicano en los procesos de

remodelación y reciclaje<sup>75, 77, 78</sup>. En la figura 8 se presenta un esquema de las tres etapas de síntesis del peptidoglicano.

### 2.III.C \_Mecanismo de Acción

Teniendo en cuenta lo expresado anteriormente, el mecanismo de acción de los  $\beta$ -lactámicos, implica la inhibición de los dominios transpeptidasa y carboxi peptidasa de las PBP. Esto lleva la detención del proceso de síntesis de peptidoglicano, pero no al proceso de degradación. El balance es la pérdida de continuidad de la malla de mureína con el consiguiente estallido osmótico del microorganismo. Como se muestra en la figura 9 la acción de estos antibióticos se debe a la similitud estereoquímica entre la D-alanil-D-alanina con las moléculas de antibióticos.

Como se mencionó anteriormente, penicilinas y cefalosporinas son las clases de antibióticos con más derivados en cuanto a espectro de acción, a continuación, se describirán brevemente estos grupos.

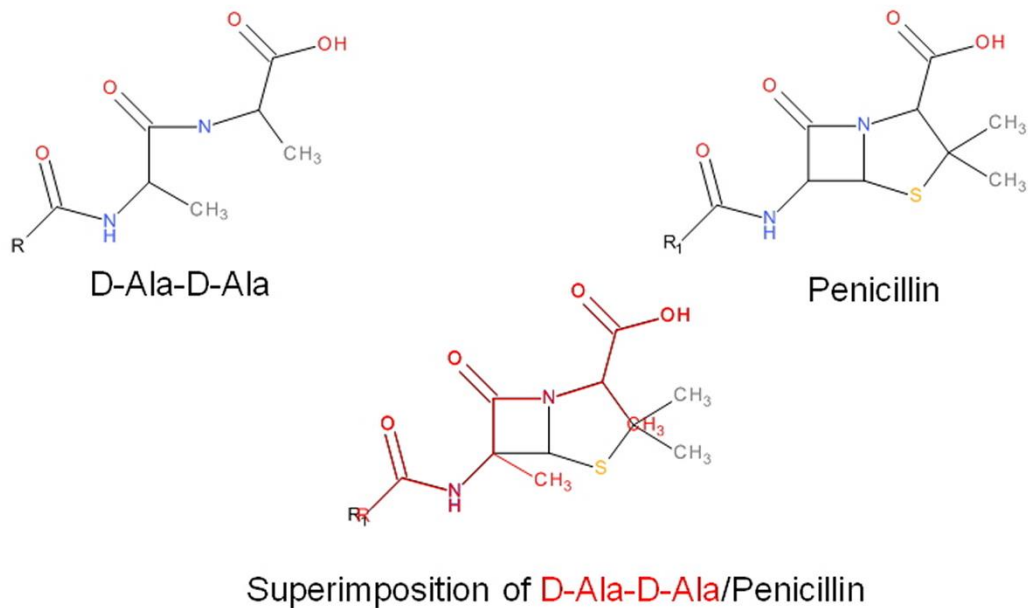


Figura 9: Modelo estructural donde se muestran las similitudes conformacionales del dímero D-ala-D-ala y penicilina. Tomada de <http://proteopedia.org>



### 2.III.D\_ Penicilinas:

Las penicilinas pueden sub clasificarse en cinco grupos en base a características estructurales que modifican su espectro de acción: 1) penicilinas naturales: penicilina G y penicilina V; 2) penicilinas resistentes a penicilinasas: meticilina, nafcilina, y penicilinas isoxazolil; 3) aminopenicilinas: ampicilina y amoxicilina; 4) carboxipenicilinas: carbenicilina y ticarcilina; 5) acil ureidopenicilinas: azlocilina, mezlocilina, y piperacilina<sup>69</sup>.

Las penicilinas naturales y las resistentes a penicilinasas presentan un reducido perfil de actividad, limitado fundamentalmente a Gram positivos. Para el caso de las amino, carboxi y ureidopenicilinas, el espectro de acción se va ampliando hacia los gram negativos, llegando a cubrir incluso *Pseudomonas* spp. en el caso de las carboxi y ureidopenicilinas.<sup>69</sup>

### 2.III.E \_Cefalosporinas:

Las cefalosporinas son productos derivados de la fermentación del hongo *Cephalosporium acremonium* (también llamado *Acremonium chrysogenum*) y se clasifican por generaciones según características generales de su actividad antibacteriana. Las de primera generación, como la cefalotina y la cefazolina, presentan buena actividad contra bacterias Gram positivas y una actividad similar a la ampicilina contra bacterias Gram negativas. A partir de las cefalosporinas de segunda generación (cefuroxime), el agregado en la cadena lateral del C7 de un grupo oximino (ver figura 10) les confiere estabilidad a ciertas  $\beta$ -lactamasas encontradas en bacterias Gram negativas como TEM-1 y SHV-1 (ver más adelante). Presentan una actividad aumentada contra bacilos Gram negativos y mantienen un variado grado de actividad sobre cocos Gram positivos. Las cefalosporinas de tercera generación como ceftriaxona cefotaxime y ceftazidime, tienen como sustituyente un grupo oximino, lo que les da el nombre de oximinocefalosporinas y presentan un marcado aumento de la potencia frente a bacilos Gram negativos. Se encuentran dos subgrupos entre estos agentes, aquellos con potente actividad contra *P. aeruginosa* (ceftazidime y cefoperazona) y aquellos que no presentan dicha actividad (cefotaxime, ceftriaxona). Las cefalosporinas de cuarta generación, como cefepime y ceftiprome, presentan el espectro de actividad más amplio, ya que son oximinocefalosporinas resistentes a las  $\beta$ -lactamasas de clase C. Estas drogas, tienen

actividad contra la mayoría de los bacilos Gram negativos inclusive *P. aeruginosa* y mantienen su actividad contra cocos Gram positivos<sup>70</sup>.

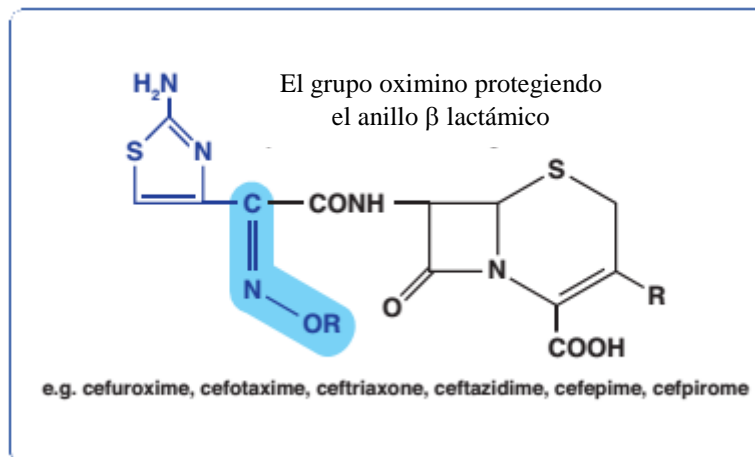


Figura 10: se muestra el grupo oximino presente en las oximinocefalosporinas que confiere protección al anillo  $\beta$ -lactámico de la acción de ciertas  $\beta$ -lactamasas de clase A. Tomado de <http://www.másgrp.com/%5CIdentification%20strips%20discs%20and%20rings%5CReferences%5CLivermore%20poster%20v2.0.pdf>.

Recientemente se han desarrollado una nueva clase de oximinocefalosporinas, particularmente diseñadas para tener actividad sobre *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina y *Streptococcus pneumoniae* con diverso grado de resistencia a otros  $\beta$ -lactámicos como el ceftobiprole y la ceftarolina, que no presenta ventajas sobre las cefalosporinas de tercera y cuarta generación en relación a enterobacterias y presentan menor actividad sobre bacilos gram negativos no fermentadores<sup>68, 79</sup>.

### 2.III.F \_inhibidores de $\beta$ -lactamasas

Los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas originalmente comprendían moléculas derivadas de  $\beta$ -lactámicos, como ácido clavulánico y derivados sulfonados del ácido penicilánico (ver figura 7)<sup>69</sup>. Estos compuestos que presentan una débil actividad antibacteriana, son potentes inhibidores de  $\beta$ -lactamasas fundamentalmente de clase A, y en menor medida de clase D (ver más adelante), restableciendo en buena parte la actividad antibacteriana del  $\beta$ -lactámico al cuál se lo asocie. Los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas actúan principalmente como “sustratos suicidas” a través de la formación de un complejo acil enzima irreversible con la  $\beta$ -lactamasa, llevando a la pérdida de la actividad enzimática. Pertenecen a esta clase de inhibidores ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam<sup>69</sup>

En los últimos años se han desarrollado nuevas moléculas inhibidoras, no derivadas de  $\beta$ -lactámicos, como el avibactam, con capacidad para inhibir  $\beta$ -lactamasas de clase A, C y D, existiendo ya algunas combinaciones con aztreonam, ceftazidime y ceftaroline<sup>67, 68</sup>.

### 2.III.G \_Mecanismos de resistencia adquirida a $\beta$ -lactámicos:

La utilización desmedida de estos antibióticos tiene como resultado la aparición de microorganismos con múltiples mecanismos de resistencia, no solamente a nivel hospitalario, sino también a nivel comunitario.

Estos clásicamente pueden dividirse en tres tipos:

#### 2.III.G.a \_Alteración del Sitio Blanco de acción

#### 2.III.G.b \_Trastornos de Permeabilidad y eflujo activo

#### 2.III.G.c \_Hidrólisis enzimática mediada por $\beta$ -lactamasas.

##### 2.III.G.a \_Alteración del sitio blanco de acción:

Se reconocen fundamentalmente dos alternativas:

2.III.G.a.i \_La producción de PBP's adicionales de baja afinidad por el antibiótico. En este caso, enzimas inexistentes en las cepas sensibles son expresadas en las cepas resistentes. Estas nuevas PBP son funcionalmente activas y reemplaza la acción de las PBP originales, como ocurre con *Staphylococcus aureus* meticilino resistente<sup>80</sup>.

2.III.G.a.ii\_ La producción de modificaciones en las PBP originales que generan la formación de una enzima con baja afinidad por los  $\beta$ -lactámicos. En este caso se pueden describir dos posibilidades, i. la producción de eventos de recombinación interespecie, en los que se reemplazaron partes del gen normal que codifica la PBP, por fracciones de genes homólogos de especies altamente relacionadas como sucede con *Streptococcus pneumoniae*<sup>81</sup>. ii. la ocurrencia de mutaciones puntuales en los genes que codifican para las PBP, que también generan disminución de la afinidad de dichas enzimas. Este tipo de resistencia puede observarse en especies como *Neisseria gonorrhoeae*<sup>82</sup>, *Haemophilus influenzae*<sup>83</sup>, *Pseudomonas aeruginosa*<sup>84</sup> y recientemente se ha asociado a resistencia a meticilina y cefalosporinas de quinta generación<sup>85 86</sup>.

### 2.III.G.b\_Impermeabilidad y eflujo:

Dentro de estos mecanismos, el más importante y estudiado en bacilos Gram negativos, es debido a la aparición de mutantes deficientes en una o más porinas de la membrana externa <sup>84, 87, 88</sup>.

Como ejemplo se encuentra la resistencia a Imipenem en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* <sup>84</sup> donde la deficiencia en una porina denominada D2, por donde ingresa el antibiótico, juega un rol preponderante.

En enterobacterias incluyendo *E. coli* se ha reportado resistencia a carbapenemes mediado por la interacción de alteraciones de porinas y presencia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, que solo hidrolizan carbapenemes de forma marginal por si mismas <sup>87, 88</sup>.

La resistencia por eflujo es un mecanismo inespecífico, que afecta a diferentes grupos de antibióticos como los  $\beta$ -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol entre otros <sup>84, 89</sup>.

### 2.III.G.c\_Producción de $\beta$ -lactamasas:

Es el mecanismo más importante y frecuente de los observados y consiste en la hidrólisis enzimática de: penicilinas, cefalosporinas, pudiendo alcanzar a los carbapenemes.

#### 2.III.G.c.i\_Clasificación:

Basándose en datos de la secuencia parcial del DNA de las  $\beta$ -lactamasas, Ambler and Scott (Ambler RP and Scott GK 1980) propusieron una clasificación estructural, definiendo 4 clases: A, B, C y D<sup>90</sup>.

Las pertenecientes a las clases A, C y D son serin-enzimas (peniciloil-serin-transferasas) <sup>91, 92</sup>(Medeiros A 1997), caracterizadas por la presencia obligada de una serina en el sitio activo, que media la reacción de hidrólisis.

Por su parte las enzimas de clase B tienen una o dos moléculas de zinc asociados al sitio activo, por lo que se las considera metalo- $\beta$ -lactamasas. Estas enzimas actúan a través de un mecanismo diferente, ya que no se forman uniones covalentes entre la enzima y el antibiótico, sino que son las moléculas de Zinc las que atacan directamente a los grupos carbonilo y amida de todos los  $\beta$ -lactámicos en general, salvo los monobactámicos<sup>93</sup>.

En las cuatro clases de enzimas, se encuentran variantes capaces de hidrolizar oximinocefalosporinas, mientras que solo las de clase B (todas) y algunas pocas variantes de las de clase A y D alcanzan a hidrolizar carbapenemes<sup>94, 95</sup>.

Las  $\beta$ -lactamasas de mayor relevancia sobre la salud humana son las de clase A. Esto es debido al aumento de su perfil de sustratos que llegan a hidrolizar oximinocefalosporinas y carbapenemes y a su gran diseminación mundial entre diferentes géneros bacterianos. Dentro de las carbapenemásas de clase A se destacan KPC-2 y sus derivados y en menor medida algunas variantes de GES, como ser GES-2, GES-4, GES-5<sup>95</sup>. Las enzimas de clase A, capaces de inactivar oximinocefalosporinas, y a su vez inhibibles por moléculas de tipo ácido clavulánico, reciben el nombre de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

En el año 1989, Karen Bush establece una clasificación funcional de las  $\beta$ -lactamasas, la cual es actualizada en 1995 por Bush, Jacoby y Medeiros y vuelta a revisar en el año 2010 por Bush y Jacoby<sup>94, 96, 97</sup>. En estas se incluyen aspectos como los pesos moleculares, puntos isoeléctricos, perfiles de sustrato y capacidad de ser inhibidas por sustancias como el ácido clavulánico y tazobactam o EDTA.

Esta clasificación, que presenta una gran utilidad para presumir la presencia de enzimas en el laboratorio clínico, tiene buena correlación con la clasificación de Ambler, como puede verse en la Tabla 1.

Tabla 1: Principales propiedades de los distintos grupos de  $\beta$ -lactamasas. Se muestra la correlación entre la clasificación de Ambler de 1980 y la Bush y Jacoby de 2010<sup>90, 94</sup>. Tomada y modificada de Bush y Jacoby 2010. CLA: ácido clavulánico, TZB: tazobactam.

Clase molecular según Ambler	Clasificación de Bush/Jacoby (2010)	Principales sustratos	Inhibibles por		Característica enzimática	Enzimas representativas
			CLA o TZB	EDTA		
A	2a	Penicilinas	+	-	Hidrolizan mejor bencilpenicilinas que cefalosporinas	PC1
	2b	Penicilinas y cefalosporinas de primera generación	+	-	Perfil de hidrólisis similar para bencilpenicilinas y C1aG	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	Oxiiminocefalosporinas, monobactámicos	+	-	Hidrolisis aumentada para oxiiminocefalosporinas y monobactámicos	BLEE de la familia CTX-M, PER-1/2, derivadas de TEM1/2 o SHV-1, TEM-30 a 40, 44-45;
	2br	Penicilinas	-	-	Resistencia a CLA/TZB/SLB	SHV-10, 26, 49
	2ber	Oxiiminocefalosporinas, monobactámicos	-	-	Hidrolisis aumentada para oxiiminocefalosporinas con resistencia a CLA/TZB/SLB	TEM-50, 68, 89, 109, 121, 125, 151-52, 154, 158
	2c	Carbenicilina	+	-	Hidrolisis aumentada para carbenicilina	PSE-1, CARB-3
	2ce	Carbenicilina, cefepime	+	-	Hidrolisis aumentada para carbenicilina, cefepime, cefpirome	RTG-4
	2e	Oxiiminocefalosporinas	+	-	Hidrolisis de cefalosporinas, inhibibles por CLA pero no por TZB	CepA
	2f	Carbapenemes	Variable	-	Hidrólisis de carbapenemes y oxiiminocefalosporinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
B (B1)	3a	Carbapenemes	-	+	Amplio espectro de hidrólisis incluyendo carbapenemes pero no aztreonam	VIM-2, IMP-1, SPM-1, NDM-1
B (B3)						L1, CAU-1, GOB-1 FEZ-1
B (B2)	3b	Carbapenemes	-	+	Hidrólisis preferencial de carbapenemes	CphA, Sfh-1
C	1	Cefalosporinas	-	-	mejor hidrólisis de cefalosporinas que penicilinas, hidrolisis de cefamicinas	AmpC de <i>E. coli</i> , P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
	1e	Cefalosporinas	-	-	Hidrólisis aumentada a CAZ y a veces otras oxiiminocefalosporinas	GC-1, CMY37
D	2d	Cloxacilina	variable	-	Hidrolisis aumentada para cloxacilina u oxacilina	OXA-1-10
	2de	Oxiiminocefalosporinas	variable	-	Hidrolisis de cloxacilina, oxacilina y oxiiminocefalosporinas	OXA-11, 14-19
	2df	Carbapenemes	variable	-	Hidrolisis de cloxacilina, oxacilina y carbapenemes	OXA-23-27, 33, 40, 48, 49, 51, 54, 55, 58,

### 2.III.G.c.ii\_Modificaciones del perfil de sustrato:

Desde el punto de vista evolutivo, se reconocen 2 alternativas para que una  $\beta$ -lactamasa de clase A tenga capacidad hidrolítica para ser una BLEE de significado clínico: la ocurrencia de mutaciones puntuales en el gen codificante de una  $\beta$ -lactamasa de espectro ampliado (BLEA) y modificaciones o reordenamiento del entorno genético del gen.

En el primer caso, se produce la expansión del perfil de sustrato debido a mutaciones puntuales del gen codificante, a partir de enzimas con capacidad de hidrólisis reducida a penicilinas y cefalosporinas de primera generación.

El grupo prototipo de estas BLEE son las derivadas de TEM-1 y 2. Estas enzimas constituyen uno de los grupos más extenso de  $\beta$ -lactamasas, incluyendo al día de hoy más de 220 variantes (K. Bush, T. Palzkill y G.A. Jacoby, <http://www.lahey.org/studies/webt.htm>).

En general estas se originan por 1 a 4 modificaciones aminoacídicas de TEM-1 o TEM-2 que son responsables por la actividad de las BLEE derivadas de TEM, siendo las más frecuentes: Glu-104, Arg-164, Ala-237, Gly-238 and Glu-240<sup>91-98</sup> Fig 11.

Otro grupo importante de  $\beta$ -lactamasas que evoluciona de esta manera son las derivadas de SHV, de las cuales se describen más de 190 variantes (Jacoby, G.A and K.Bush <http://www.lahey.org/studies/webt.htm>).

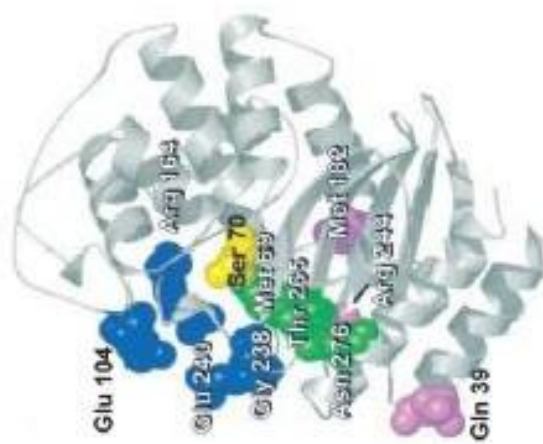


Figura 11 Modelo tridimensional de TEM-1 donde se señalan los principales aminoácidos involucrados en la modificación del perfil de sustrato de dicha enzima. En azul se resaltan las principales posiciones que se modifican en las BLEE (según Majiduddin & Palzkill<sup>98</sup>)

Alternativamente, las modificaciones pueden ocurrir no en el gen codificante, sino en el entorno genético. En este caso se trata de modificaciones que aumentan la expresión del gen y no las capacidades de la enzima codificada (que constituye una BLEE aunque no sea detectable).

Las  $\beta$ -lactamasas más importantes en salud, afectadas por estas modificaciones son las pertenecientes al grupo de las CTX-M. Así los precursores prácticamente inalterados de estas se han encontrado en el cromosoma de especies de *Kluyvera* spp. las cuales las expresan a bajo nivel.<sup>99, 100</sup>

Existen además grupos de  $\beta$ -lactamasas que no se conocen sus ancestros o su evolución como ocurre con PER-1 y PER-2<sup>101</sup>.

Las BLEE pertenecientes a la familia de CTX-M son las más diseminadas a nivel mundial, considerándose las como pandémicas<sup>102, 103</sup>.

Como ya se mencionó estas enzimas tienen su origen en el cromosoma de especies de *Kluyvera* spp y al día de hoy se reconocen 168 variantes (<http://www.lahey.org/studies/> consultado el 9/3/2016)<sup>104, 105</sup>. En base a su identidad de secuencias se reconocen 5 grupos denominados del 1 al 5 o en base al primer integrante detectado de cada uno de ellos (ver figura 12).

Así el grupo 1 está constituido por las BLEE relacionadas a CTX-M-1 e incluye a una de las enzimas más diseminadas en el mundo como es CTX-M-15; en el grupo 2 se encuentran las enzimas relacionadas a CTX-M-2 que es una de las más frecuentes en el Cono Sur<sup>104</sup>, el grupo de 8 es uno de los más pequeños y tiene a su representante característico en CTX-M-8, el grupo 9 es uno de los más grandes e incluye además de CTX-M-9, a CTX-M-14 y CTX-M-19 y finalmente el grupo 25 incluye a CTX-M-25 y algunas pocas derivadas<sup>104, 105</sup>.

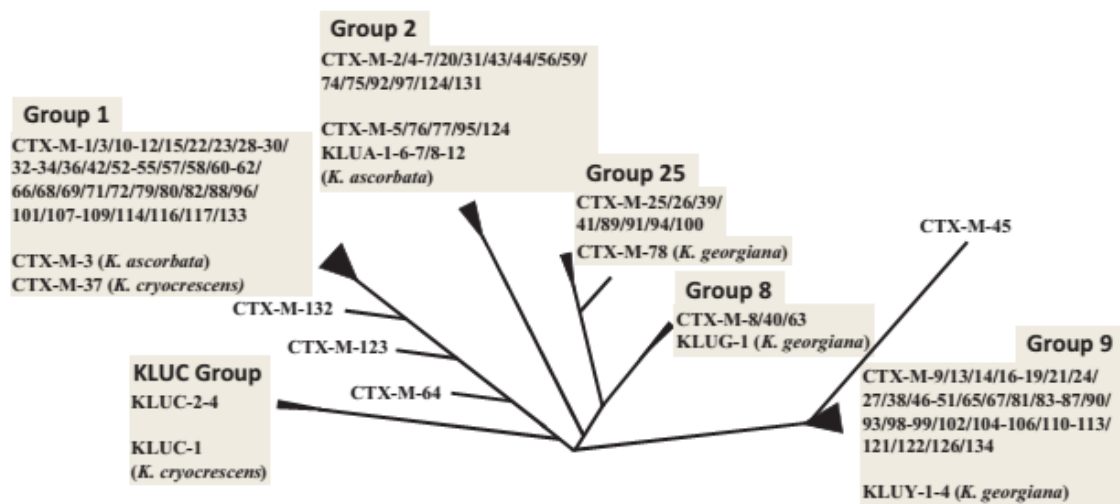


Figura 12: Diagrama de árbol filogenético mostrando las relaciones entre los distintos grupos de las familias de BLEE CTX-M y sus principales integrantes. Tomado de D' Andrea y cols.<sup>105</sup>

### 2.III.G.c.iii\_ Movilización de BLEE de tipo CTX-M:

Como ya se mencionó, la ubicación de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> en el ADN “cromosómico” de especies de *Kluyvera* spp. han llevado a que se proponga a este género bacteriano como origen evolutivo de estas BLEE<sup>99, 100</sup>.

La captura, incremento de los niveles de expresión y movilización de dichos genes por parte de un número relativamente discreto de transposones simples denominados Secuencias de Inserción (IS) ha sido fundamental para la diseminación de este tipo de



enzimas<sup>106</sup>. Dentro de las principales IS relacionadas a movilización de estos genes se encuentran *ISEcp1* e *IS26*<sup>106, 107</sup>, habiéndose demostrado que la presencia de *ESEcp1* corriente arriba es suficiente para la movilización de genes de resistencia<sup>108, 109</sup>.

Alternativamente, un grupo no menor de CTX-M fueron movilizados por una estructura llamada inicialmente ORF513 y asimilada recientemente a una secuencia de inserción inusual denominada *ISCR1*<sup>110</sup>. La frecuente asociación de *ISCR1* a integrones de clase 1, dieron origen a los integrones de clase 1 complejos, que constituyeron el entorno genético de BLEEs de tipo CTX-M-2 y CTX-M-14 entre otras<sup>106</sup>.

Finalmente, la incorporación de estas estructuras en plásmidos conjugativos de amplio rango de huésped es el paso final para la diseminación de estos genes de resistencia entre especies e incluso familias bacterianas diferentes. Los plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncFII, IncA/C, IncL/M, IncN e IncII son reconocidos como plásmidos epidémicos de resistencia debido a su globalizada asociación con genes de distintas  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro<sup>111</sup>.

## 2.IV: Quinolonas:

Las quinolonas constituyen una extensa familia de antibióticos de origen completamente sintético, cuyo primer integrante, el ácido nalidixico, fue desarrollado en 1962 a partir de la cloroquina<sup>112</sup>. En el año 1963 se publican los primeros resultados de ensayos clínicos en humanos con infecciones urinarias<sup>113</sup> iniciándose su comercialización en 1967<sup>112</sup>.

Si bien el origen sintético hacía suponer que la ocurrencia de resistencia sería esporádica, ya los primeros estudios mostraban valores cercanos al 13% en *E.coli*<sup>113</sup>.

### 2. IV: a\_Estructura Química:

La estructura básica de las quinolonas es un doble anillo que presenta típicamente un nitrógeno en posición 1, un grupo carboxilo en posición 3 y un grupo carbonilo en posición 4 (ver figura 13)<sup>114</sup>.

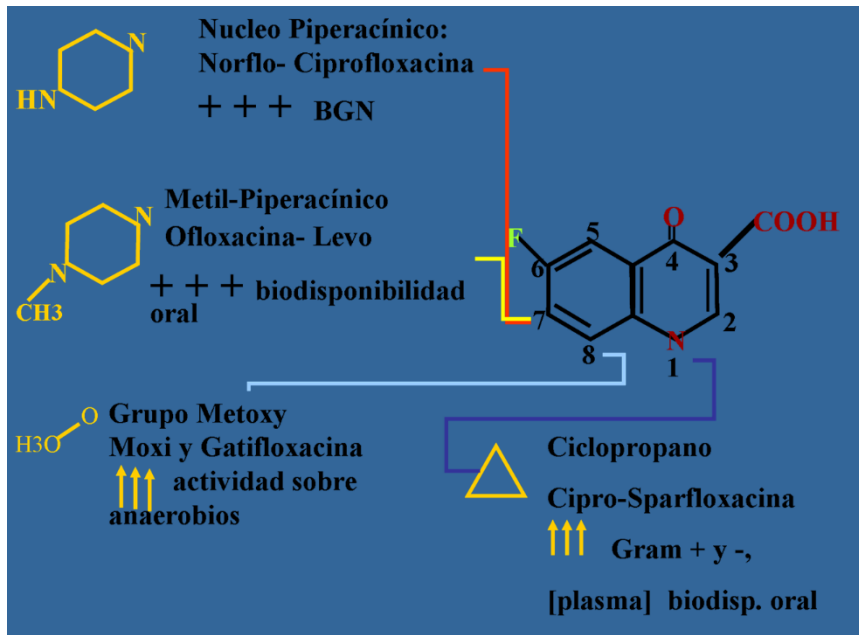


Figura 13: Esquema general de las fluorquinolonas. Se muestra el núcleo común incluyendo el nitrógeno en posición 1, el grupo carboxilo en posición 3 el carbonilo en 4 y un átomo de flúor (F) en posición 6 (ver texto).

El agregado de flúor en el carbono 6 dio origen a las fluorquinolonas, lo que disminuye la probabilidad de aparición de mutantes resistentes y aumenta la actividad sobre bacilos Gram negativos y Gram positivos<sup>112, 114</sup>.

La introducción de distintos sustituyentes en las posiciones 1, 7 y 8 modifica el espectro de actividad y las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de las nuevas quinolonas. Algunos de los sustituyentes utilizados y las propiedades que confieren se muestran en la Figura 13.

## 2.IV.b\_ Sitio Blanco las Topoisomerasas:

Las quinolonas actúan inhibiendo la acción de las ADN girasas y las topoisomerasas tipo IV bacterianas. A los efectos de comprender mejor el mecanismo de acción y alguno de los mecanismos de resistencia a quinolonas se describirá brevemente el funcionamiento de dichas enzimas .

Las ADN topoisomerasas catalizan cambios en la topología del ADN que permiten la transición entre formás relajadas y súper enrolladas de ADN. Si bien la presencia de estas enzimas es universal en los seres vivos, las diferencias estructurales entre procariontas y eucariotas, permite que las quinolonas actúen selectivamente sobre las primeras<sup>115</sup>. Las

ADN topoisomerasas se dividen en tipo I y II dependiendo que cliven una o las dos hebras del ADN respectivamente.

Durante la relajación de las hebras de ADN, las topoisomerasas utilizan la energía liberada durante la propia reacción, mientras que la introducción de un súper enrollamiento negativo requiere de la hidrólisis de ATP para llevarlo a cabo<sup>115</sup>. Las únicas topoisomerasas capaces de llevar a cabo esta tarea son las tipo II<sup>115</sup>.

En procariotas pueden reconocerse dos tipos de topoisomerasas tipo II que reciben los nombres de girasa y topoisomerasa IV<sup>115, 116</sup>. En ambos casos están formadas por tetrámeros compuestos por dos subunidades codificadas (para los casos de enterobacterias) por los genes *gyrA* y *gyrB* o *parC* y *parD* respectivamente.

Mientras que las girasas controlan los súper enrollamientos del ADN y reducen la tensión topológica generada por la translocación de los complejos de replicación y transcripción a lo largo del ADN, las topoisomerasas IV liberan hebras de ADN concatenadas luego de la replicación<sup>115, 116</sup>.

Se describirá a continuación el modelo propuesto para el funcionamiento de la DNA girasa de *E.coli* (o modelo de las dos puertas de Roca y Wang)<sup>117</sup>

Se reconocen tres interfaces en la ADN girasa que pueden encontrarse en conformación abierta o cerrada siendo estas: a) el dominio N terminal de GyrB o puerta N, b) la interfase GyrA-GyrB-ADN o puerta ADN y el extremo C terminal de GyrA o puerta de salida. La explicación del funcionamiento de la girasa se realiza en la Figura 14.

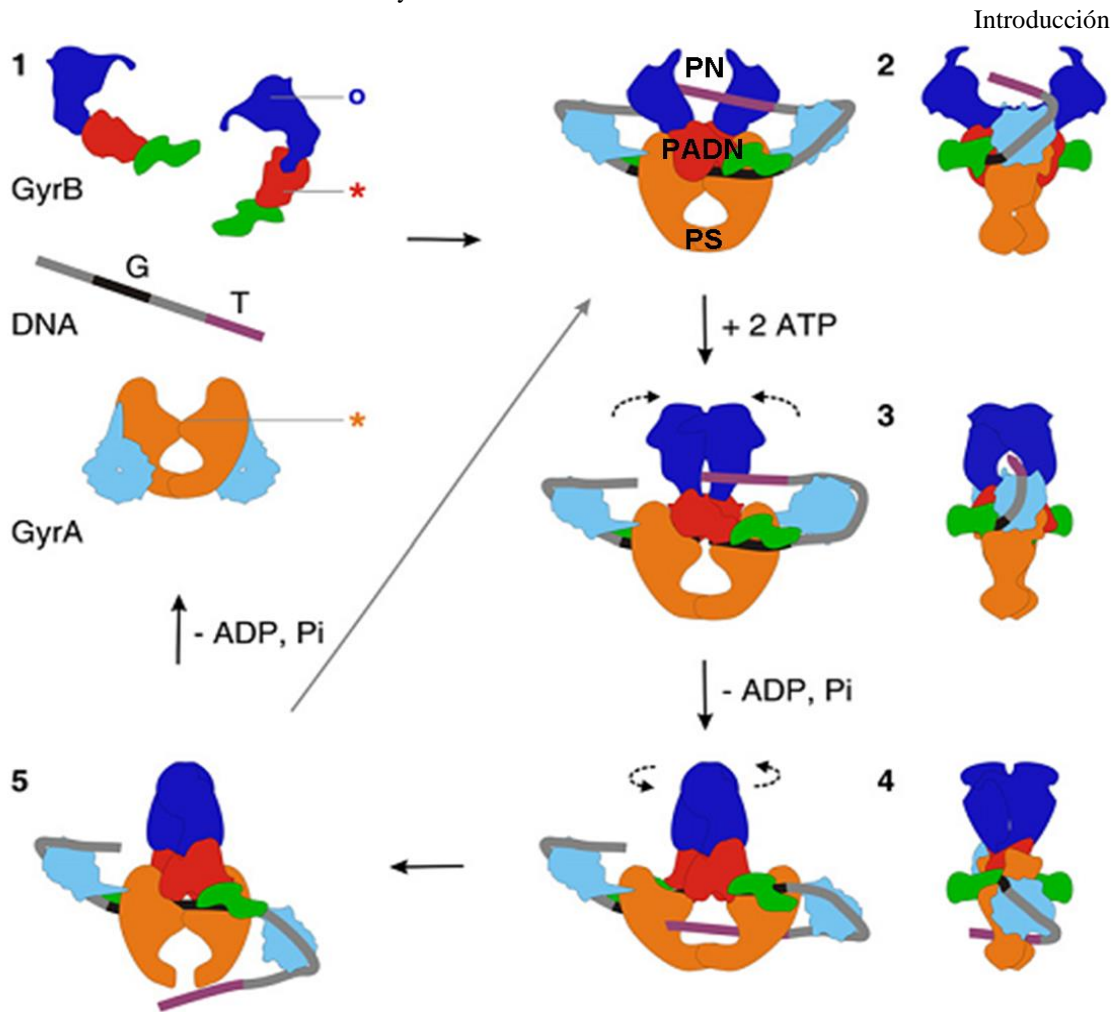


Figura 14. Esquema del mecanismo de superenrollamiento de la ADN girasa, sacado y modificado de Costenaro y col. <sup>118</sup>. **Paso 1:** Se muestran las sub unidades de la girasa tal cual se presentan en solución. Las dos sub unidades de GyrA se encuentran como dímeros, mientras que las subunidades de GyrB se ven como monómeros. Se representa un fragmento de ADN donde se señalan el segmento G (a ser clivado) para introducir el super enrollamiento positivo por pasaje del segmento T **Paso 2:** Atrapamiento del ADN alrededor de la enzima, presentando el segmento T sobre el segmento G con un entrecruzamiento positivo. **Paso 3:** Una vez formados los dímeros de GyrB se produce la unión del antibiótico y el atrapamiento del segmento T, mientras que el segmento G es transitoriamente clivado. **Paso 4:** La hidrólisis de una molécula de ATP permite la rotación de GyrB, lo que produce el pasaje del segmento T a través del segmento G clivado. **Paso 5:** La religación del segmento G introduce dos nuevos super enrollamientos negativos en el DNA. La reacción culmina con la hidrólisis de una nueva molécula de ATP que permite la liberación del segmento T lo cuál libera a la enzima. El asterisco señala el sitio de clivado del ADN y el círculo el bolsillo de unión a ATP.

## 2.IV.c\_Mecanismo de Acción

Las quinolonas, que no pueden unirse ni al ADN ni a las girasas por separado, actúan formando un complejo ternario ADN-girasa-quinolona una vez que el ADN ya ha sido clivado, pero antes de su religación. La interacción con el ADN sería por intercalamiento, de modo que los anillos aromáticos de las quinolonas se unen al sitio donde el ADN será cortado. De este modo producen el desalineamiento de ambos extremos del ADN impidiendo la religación<sup>115</sup>.

Por otro lado, interactúa con discretas regiones de ambas sub unidades de las girasas (aproximadamente 40 aminoácidos) de modo de impedir la liberación de las mismas del ADN. El resultado final es la estabilización y la acumulación de los complejos ternarios<sup>119, 120</sup>. La detención del funcionamiento de la horquilla de replicación y el clivado del ADN sin posterior religado, llevan a las quinolonas a alcanzar su efecto bactericida sobre los microorganismos sensibles<sup>115</sup>.

#### 2.IV.D\_Mecanismos de resistencia a quinolonas:

Los primeros mecanismos de resistencia en ser descritos para las quinolonas fueron: alteraciones en los sitios blanco y disminución de la acumulación de las mismas en el interior bacteriano debido a impermeabilidad de la membrana y/o a sobre expresión de bombas de eflujo<sup>121</sup>. En ambos casos los mecanismos de resistencia estaban codificados a nivel del cromosoma bacteriano y no eran transferibles horizontalmente.

##### 2.IV.D.a\_Alteraciones del sitio blanco:

Si bien como ya se mencionó, las quinolonas interactúan tanto con las topoisomerasas como con el ADN, la resistencia a quinolonas habitualmente se produce debido a la ocurrencia de mutaciones en los genes que codifican para las distintas topoisomerasas, particularmente en una pequeña zona de dichos genes denominada RDRQ (Región Determinante de Resistencia a Quinolonas) en inglés QRDR. Para el caso de GyrA la RDRQ involucra cambios aminoacídicos entre las posiciones 51 a 106, mientras que las mutaciones en *parC* involucran las posiciones 23 a 176. Si bien las RDRQ involucran alrededor de 50 y 150 nucleótidos respectivamente, la mayoría de las mutaciones descritas se dan en las posiciones 83 y 87 en GyrA y 80 y 84 en ParC<sup>122</sup>. Para el caso de las quinolonas no fluoradas como el ácido nalidíxico, alcanza una mutación para conferir alta resistencia, sin embargo para las fluoroquinolonas se requiere la acumulación de dos mutaciones en *gyrA* y al menos una más en *parC*<sup>121</sup>.

##### 2.IV.D.b\_Disminución en la captación de quinolonas:

La disminución en el pasaje de las quinolonas al interior de la bacteria está usualmente asociada a dos factores, el aumento de la impermeabilidad a estos antibióticos y/o la sobre expresión de bombas de eflujo, naturalmente presentes en los microorganismos.

#### 2.IV.D.b.i\_ Alteraciones en la permeabilidad:

Se asocian fundamentalmente a la disminución en la expresión de porinas, fundamentalmente OmpF en *E. coli* y proteínas homólogas en otras enterobacterias como *K. pneumoniae* <sup>123</sup>

#### 2.IV.D.b.ii\_ Bombas de eflujo:

Las bacterias tienen un amplio número de bombas de eflujo, fundamentalmente asociadas a la membrana interna, lo cual les permite eliminar diversas sustancias tóxicas fuera del citoplasma. Se reconocen 5 familias de bombas de eflujo, que se denominan en inglés MATE (Multidrug And Toxic-compound Extrusion), MFS (Major Facilitator Superfamily), SMR (Small Multidrug Resistance), RND (Resistance Nodulation Division) y ABC (ATP binding cassette) (ver figura 15).

Si bien AcrAB-TolC es la bomba de eflujo que más contribuye a la resistencia a quinolonas en *E. coli*; las 5 familias han sido asociadas en mayor o menor medida a resistencia a dichos antibióticos, ya sea en expresión en estado basal o en condiciones de hiper-expresión por alteración de mecanismos regulatorios <sup>124 125</sup>. A excepción de la familia SMR donde solo se ha identificado una sola bomba perteneciente a este grupo que expulsa quinolonas (Mmr en *Mycobacterium smegmatis*), las otras cuatro familias han sido encontradas en diversos microorganismos incluyendo la familia *Enterobacteriaceae* <sup>125</sup>.

En la Figura 15 se muestra un esquema de las 5 familias de bombas (modificado y adaptado de Piddock 2006 y Li et al 2015 <sup>124, 126</sup>, incluyendo en cada caso un ejemplo de bombas involucradas en resistencia a quinolonas.

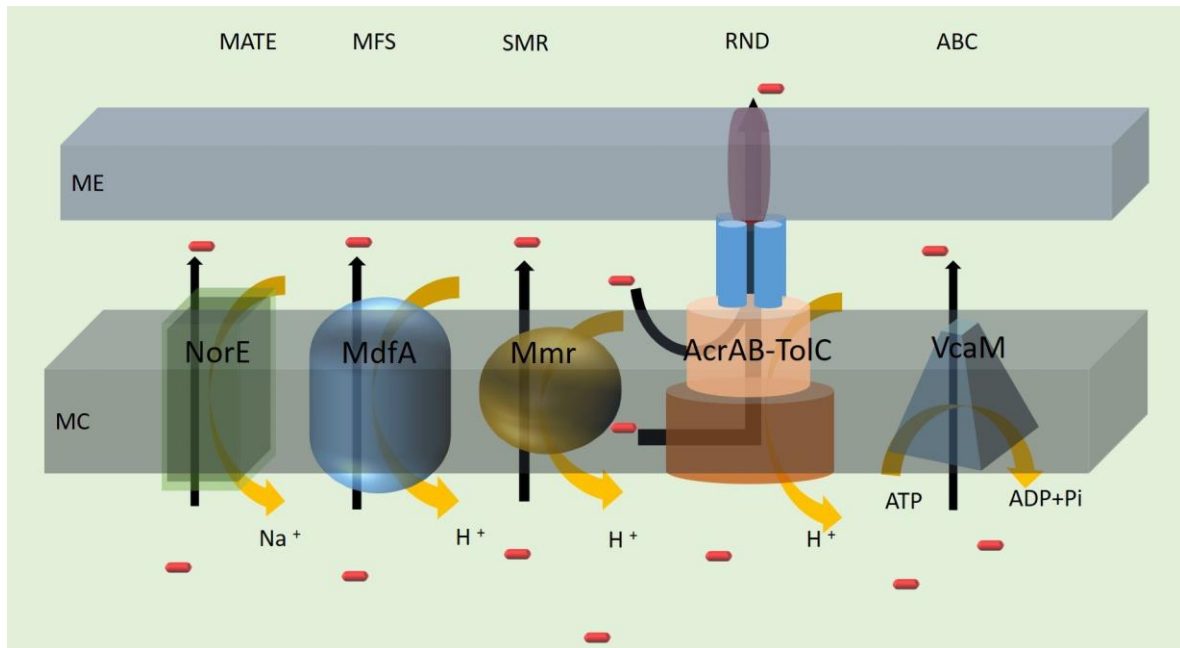


Fig. 15: Esquema de las 5 familias de bombas de eflujo. MATE (Multidrug And Toxic-compound Extrusion), MFS (Major Facilitator Superfamily), SMR (Small Multidrug Resistance), RND (Resistance Nodulation Division) y ABC (ATP binding cassette). El flujo de las moléculas se representa con las flechas negras, los antibióticos se representan como “píldoras rojas”. Los ejemplos puestos en cada grupo han sido reportados como responsables de poder exportar quinolonas. Por una descripción más detallada de los compuestos excluidos por cada tipo de bomba ver Poole K 2005<sup>125</sup>

#### 2.IV.D.c\_Mecanismos transferibles de resistencia a quinolonas:

Luego de la introducción de las fluoroquinolonas en el arsenal de antimicrobianos en el año 1980, no fue hasta 1998 que se describió el primer caso de resistencia transferible a quinolonas<sup>127</sup>. Se le llamó a este gen *qnr* por quinolone-resistance, y fue el primero de una larga serie de alelos y variantes que al día de hoy involucra más de 100 alelos que se distribuyen en 7 variantes distintas de *qnr* <http://www.lahey.org/qnrStudies/>.

Se reconocen tres mecanismos diferentes de resistencia transferible a quinolonas:

- Resistencia por protección o enmascaramiento del sitio blanco.
- Resistencia por inactivación enzimática.
- Bombas de eflujo

a) Resistencia por enmascaramiento del sitio blanco:

Como ya se comentó este fue el primer mecanismo descrito, corresponde a una proteína codificada por el gen *qnr* presente en plásmidos conjugativos y, dentro de estos, asociado a integrones de clase 1<sup>128</sup>. Su presencia es capaz de cuadruplicar los niveles de concentración inhibitoria mínima (CIM) de una cepa sensible<sup>129</sup>.

El producto del gen *qnr* es una proteína (Qnr) de 218 aminoácidos perteneciente a una familia de proteínas de pentapéptidos repetidos. Esta proteína se une específicamente a la ADN girasa y la topoisomerasa IV y se postula que de esta manera evita la formación del complejo ADN-Girasa requerido para que las quinolonas ejerzan su efecto<sup>130, 131</sup>. Si bien la protección conferida por esta proteína es de bajo nivel, la importancia clínica de este mecanismo se explica por su capacidad de complementar la resistencia cromosómica a quinolonas, conferida por mutaciones en las topoisomerasas, disminución en la expresión de porinas, y sobreexpresión de diversas bombas de eflujo mediado por mutaciones en genes reguladores<sup>132</sup>. Adicionalmente, facilitaría la selección de mutaciones cromosómicas a concentraciones de quinolonas, que de otro modo resultarían letales en ausencia de dicho gen.

El gen antes descrito fue denominado *qnrA* ya que más tarde se identificaron, en especies de enterobacterias, otros miembros de la familia de pentapéptidos repetidos codificados en plásmidos como QnrB<sup>133</sup>, QnrC<sup>134</sup>, QnrD<sup>135</sup> y QnrS<sup>136</sup>.

En 2008 se describe un nuevo gen perteneciente a la familia *qnr* asociado a superintegrones de *Vibrio cholerae* denominado *qnrVC*<sup>137</sup>. A diferencia de los demás grupos de genes *qnr* los derivados de *qnrVC* tienen dos características particulares: por un lado presentan una estructura de gen cassette con un sitio *attC* para reconocimiento de *intI1*<sup>137</sup> y por otro, pese a tener dicha estructura, presentan su propio promotor {da Fonseca, 2012 #1527}.

Como ya se comentó, al momento se describen más de 100 alelos distribuyéndose en 7 variantes de *qnrA*, 88 de *qnrB*, 1 *qnrC*, 2 *qnrD*, 9 *qnrS* y 7 *qnrVC* <http://www.lahey.org/qnrStudies/>.

#### b\_ Resistencia por inactivación enzimática:

Un segundo mecanismo de resistencia transferible a quinolonas es el conferido por el gen *aac(6')-Ib-cr*, el cual resulta de dos mutaciones (codones 102 y 179) en el gen *aac(6')-Ib*. Este último, codifica para una aminoglucósido acetiltransferasa que brinda resistencia a kanamicina, amikacina, tobramicina y fluoroquinolonas<sup>139</sup>. La modificación enzimática de las fluorquinolonas ocurre por la acetilación del nitrógeno en el anillo piperazilínico. Ciprofloxacina y norfloxacina son los únicos compuestos que poseen un grupo piperazilínico no sustituido, siendo las únicas fluoroquinolonas modificadas por esta nueva enzima. En base a lo antedicho puede darse la selección de resistencia a dos clases distintas de drogas llevado a cabo por una misma enzima<sup>139</sup>.



Los niveles de resistencia conferidos por este mecanismo son similares a los descritos para *qnr* alcanzando a cuadruplicar los niveles de resistencia a ciprofloxacina en relación a la misma cepa antes de incorporar el gen *aac(6)'-Ib cr*. Al igual que lo descrito para los genes *qnr* la presencia de estos genes si bien confiere bajos niveles de resistencia favorece la selección de mutantes resistentes por modificaciones en diversos genes que confieren niveles más altos de resistencia.

La acumulación de estos mecanismos transferibles en un mismo microorganismo comienza a hacerse más frecuente, fundamentalmente en *K. pneumoniae* productor de CTX-M-15<sup>140, 141</sup>. La presencia de *qnr* y *aac(6)'-Ib cr* en un mismo plásmido, son capaces de conferir valores de resistencia absoluta a ciprofloxacina, elevando los valores de CIM de ciprofloxacina a 1 mg/L.

#### c\_ Bombas de eflujo:

Estrictamente hablando, la primera bomba de eflujo transferible capaz de conferir sensibilidad disminuida a quinolonas fue *oqxAB*, la cual fue descrita en 2003 en *E. coli* resistente a olaquinox<sup>142</sup>. Sin embargo no se le asignó actividad sobre fluoroquinolonas hasta 2007<sup>143</sup>. *OqxAB* es una bomba perteneciente a la familia RND, que utiliza TolC como componente de membrana externa. Sin embargo confiere resistencia de un modo dependiente de sus niveles de expresión<sup>144</sup>

En el año 2007 se describen en Japón y Francia la segunda bomba de eflujo transferible que causa disminución de la sensibilidad a las fluorquinolonas. El gen codificante recibe el nombre de *qepA*<sup>145, 146</sup> y se designa a la proteína codificada QepA. Por similitud de secuencias y funcionalidad esta proteína pertenece al grupo de las bombas MSF presentando una alta especificidad de sustrato por norfloxacina, ciprofloxacina y enrofloxacina. La presencia de QepA puede producir aumentos de hasta 40 veces los niveles de resistencia a estos antibióticos<sup>146</sup> dependiendo de los niveles de expresión.

## 2.IV.D.d Evidencia del impacto de la resistencia de bajo nivel a fluoroquinolonas:

En modelos de infección urinaria en ratón, cuando se produce la infección con *E. coli* que presentan CIM de ciprofloxacina tan bajas como 0.19 mg/L, mediadas por la presencia de genes *qnr*, se producen fallos terapéuticos al ser tratados con ciprofloxacina a dosis equivalentes a las suministradas en humanos<sup>147</sup>. Por otro lado, utilizando el mismo modelo, CIM de ciprofloxacina tan bajas como 0.06 mg/L se asociaron a fallos terapéuticos cuando estaba presente la enzima Aac(6')Ib-cr<sup>148</sup>. En este caso, los autores evidencian un clearance de ciprofloxacina aumentado a nivel renal, lo cual es atribuido a la acción de la Aac(6')Ib-cr, sin observar disminución detectable de la concentración plasmática de ciprofloxacina. Teniendo en cuenta esta evidencia, no solamente sería necesario poder determinar los valores de CIM a fluoroquinolonas, sino también poder hacer una aproximación al mecanismo de resistencia involucrado.

## 2.V\_Multi-resistencia, Resistencia extrema y Pan resistencia a drogas:

El problema de la resistencia a antimicrobianos se agrava por la acumulación de genes que codifican para diferentes mecanismos de resistencia a múltiples drogas. Estos a su vez son recolectados y re agrupados por elementos genéticos móviles e integrones en uno o múltiples plásmidos de resistencia<sup>149, 150</sup>.

Esta situación evolutiva en el tiempo, genera un problema de nomenclatura, en el cual el término multi resistencia, resistencia extrema o extensa, son utilizados arbitrariamente para definir cosas diferentes<sup>151, 152</sup>.

En el año 2011 se publica un consenso de un comité de expertos de diferentes países e instituciones del mundo, para unificar criterios a cerca de las definiciones de microorganismos multi resistentes a drogas (MRD), extrema resistencia a drogas (XRD) y pan resistencia a drogas (PRD)<sup>153</sup>.

En este sentido se define una enterobacteria como MRD cuando un microorganismo presenta sensibilidad disminuída o resistencia al menos a un agente de tres o más categorías pre establecidas<sup>153</sup>.

Se define XRD como aquel microorganismo que presenta sensibilidad disminuída o resistencia a un agente perteneciente a todas las categorías menos dos.

Finalmente, PRD es aquel microorganismo resistente a todos los antibióticos categorizados.

Dentro de estas categorías se encuentran: aminoglucósidos, aminopenicilinas, aminopenicilinas más inhibidores de  $\beta$  lactamasas, penicilinas anti *Pseudomonas* spp. más inhibidores de  $\beta$  lactamasas, cefamicinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, monobactames, oximinocefalosporinas, cefalosporinas anti *Staphylococcus* spp meticilino resistentes, carbapenemes, fluoroquinolonas, inhibidores de la síntesis de folatos, gliciliclinas, fenicoles, ácido fosfónico, polimixinas y tetraciclinas <sup>153</sup>

## 2.VI\_Movilización de genes de resistencia

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómica, que se replican independientemente de éste y que en general codifican para proteínas que no siendo esenciales en condiciones favorables, pueden otorgar una ventaja selectiva bajo situaciones extremas <sup>154</sup>. A menudo codifican para genes de virulencia, genes vinculados a interacciones ecológicas o metabólicas, y lo más preocupante en el ámbito de la salud humana por sus implicancias, para genes de resistencia a antibióticos <sup>155</sup>.

Cada plásmido presenta un número variable pero estable de copias que puede ir desde una o dos por célula para plásmidos grandes conjugativos hasta más de 200 para pequeños plásmidos no auto movilizables como los ColE1 <sup>154</sup>.

El éxito desde el punto de vista evolutivo (considerado como la capacidad de persistir independientemente de la presencia de un factor de selección) depende de un conjunto de factores que incluyen la capacidad de diseminación vertical y horizontal de la molécula y del costo biológico que pueda imponerle alguna de las proteínas codificadas.

### 2.VI.A\_Diseminación vertical:

Está dada por el proceso denominado partición o segregación plasmídica y hace referencia a los mecanismos puestos en juego para asegurar que cada célula descendiente tenga al menos una copia del plásmido en cuestión <sup>154</sup>

En los plásmidos de bajo número de copias, este proceso se lleva a cabo por un sistema de tres componentes, A: una pequeña secuencia palindrómica denominada centrómero

(*parS*), la proteína ParA (una ATPasa que aporta energía al sistema por hidrólisis del ATP) y una proteína de unión al ADN (ParB) que actúa como un adaptador entre *parS* y ParA<sup>154</sup>.

Para los plásmidos de alto número de copias, la segregación se realizaría de forma aleatoria no siendo necesario una maquinaria específica para esto<sup>154</sup>.

La coexistencia de dos plásmidos en una misma célula que compartan el mismo sistema de partición, genera interferencia en la herencia de los plásmidos en la descendencia, lo cual se denomina incompatibilidad plasmídica<sup>156</sup>.

Se dice entonces que dos plásmidos pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad cuando su coexistencia interfiere con su segregación.

En el año 2005, Carattoli y colaboradores diseñan un protocolo para identificar 18 grupos de incompatibilidad mediante PCR en base a la amplificación selectiva de genes relacionados a la replicación y segregación plasmídica<sup>157</sup>.

Un mecanismo adicional de asegurar la segregación plasmídica es el llamado muerte post-segregacional mediado por sistemás de toxina antitoxina (o de adicción)<sup>154</sup>

## 2.VI.A.a\_Sistemás toxina-antitoxina (STA) o de adicción:

Los plásmidos de virulencia y plásmidos portadores de genes de resistencia a los antibióticos entre otros, emplean sistemás de toxina-antitoxina para asegurar su persistencia durante el proceso de replicación. El sistema toxina-antitoxina (STA) esta compuesto por una toxina que sintetizada al mismo tiempo que la antitoxina, presenta mayor estabilidad que esta última<sup>158</sup>. El resultado final es la eliminación de las células libres de plásmidos que surgen como resultado de defectos en la replicación o en los mecanismos de segregación, contribuyendo a la diseminación inter o intraespecie de dichos plásmidos<sup>159</sup>. La pérdida de los STA inducen la muerte post-segregacional (MPS), volviendo de este modo a una línea celular determinada “adicta” a los STA<sup>160</sup>.

En función del efecto inhibitorio ejercido por la antitoxina los STA pueden clasificarse en 5 tipos:

- Las de tipo I poseen un ARN antisentido que se aparee con el ARNm de la toxina;
- Las de tipo II tienen una antitoxina proteica, que al adherirse directamente a la toxina neutraliza su efecto<sup>161</sup>;

Las de tipo III poseen un ARN antitoxina (que no es antisentido) el cual interactúa directamente con la proteína tóxica <sup>162</sup>;

Las de tipo IV poseen una toxina y una antitoxina proteica, ésta última interfiere en la unión de la toxina con su sitio blanco<sup>163</sup>;

Las de tipo V tienen una antitoxina proteica, la cual corta el ARNm de la toxina <sup>164</sup>.

Los STA de tipo I y II son responsables del fenómeno de MPS o adicción <sup>165</sup>.

En la mayoría de los STA de tipo II la toxina bloquea la traducción, otras afectan la replicación de ADN bloqueando la actividad de las girasas. Por otra parte, la mayoría de las toxinas de STA de tipo I y V actúan a nivel de la membrana interna; inhiben la síntesis de ATP mediante reducción de la fuerza motriz protónica, afectando en última instancia la síntesis proteica<sup>166</sup>

Otra forma de muerte post-segregacional esta dada por los sistemas restricción-modificación (RM) compuestos por una enzima de restricción capaz de clivar ADN y una metilasa que genera metilaciones en los sitios de corte de la enzima. De este modo la enzima de restricción solo cortará ADN no metilado.

Este sistema es similar a los STA tipo IV, donde la antitoxina actuaría protegiendo al sitio blanco<sup>166</sup>

## 2.VI.B\_Diseminación Horizontal:

La diseminación horizontal de genes conlleva profundas implicancias evolutivas como la recombinación homóloga entre cepas o especies cercanamente relacionadas; la integración de nueva información genética, permitiendo una adaptación rápida a nuevos ambientes o a condiciones ambientales desfavorables y la participación en el establecimiento de procesos de cooperación microbiana <sup>167</sup>. A grandes rasgos, la transferencia horizontal de genes se da a través de tres grandes mecanismos, transformación, transducción y conjugación; cuantitativamente ésta última es la más importante <sup>168</sup>.

Se conocen dos modos de conjugación que difieren tanto en el tipo de ADN translocado (ADN monocatenario -ADNmc ó ADN bicatenario -ADNbc), como en la complejidad del sistema de transporte <sup>169</sup>.

Los plásmidos conjugativos consisten de un esqueleto compuesto por cuatro grandes módulos dedicados a la estabilidad, replicación, propagación y adaptación; además pueden incluir un bloque de elementos accesorios que codifican para características que redundan en un beneficio para la célula hospedera. En función del número de genes requeridos para la maquinaria conjugativa y la estabilización, estos plásmidos suelen presentar un gran tamaño ( $\geq 34\text{Kb}$ )<sup>170</sup>.

Los sistemas involucrados en la conjugación de ADNmc incluyen dos grandes complejos proteicos: relaxosomas y sistemas de secreción de tipo IV (SST4). El pasaje de elementos genéticos móviles a través de las membranas de las células donante y receptora se realiza con el SST4. En proteobacterias, los SST4 son complejos de proteínas que involucran una ATPasa, proteínas encargadas del apareamiento (mating-pair formation - MPF) que forman el canal de transporte, y un pilus que se une a la célula receptora<sup>171</sup>. El relaxosoma está compuesto por una relajasa (MOB) más proteínas auxiliares; la relaxasa produce un corte en el ADNbc y se une al ADNmc en el origen de transferencia. Además del relaxosoma, otro componente esencial en la maquinaria de conjugación es la proteína de acoplamiento de tipo 4 (PAT4). El PAT4 se une al complejo ADN-relaxasa y la acopla al SST4, usando ATP para translocar el complejo a través de la membrana interna<sup>172</sup>.

Por su parte, son los SST4 los que se encargan de formar el Pili F cuyo ensamblaje y funcionamiento depende de la expresión de los genes *tra*<sup>173</sup>. Dentro de estos TraA es la pilina y TraV una proteína de membrana externa que formaría un complejo TraV/TraK/TraB transmembrana<sup>174</sup>. Mutantes en cualquiera de estas proteínas generan ausencia de formación de Pili y actividad de donante de ADN indetectable.

## 2.VI.C\_Costo biológico:

Si bien la presencia de mecanismos de resistencia puede suponer una ventaja selectiva en ambientes con antibióticos, algunos de ellos pueden imponer un costo biológico en ausencia del antimicrobiano en cuestión<sup>175</sup>.

Dentro de las  $\beta$ -lactamasas, las de clase B, C y D han sido claramente vinculadas a un costo biológico importante<sup>176-178</sup>. En el caso de las de clase C y D vinculado a actividad DD-endopeptidasa que interfiere en la síntesis de peptidoglicano<sup>177</sup>. Por su parte las de clase B o metalo  $\beta$ -lactamasas interferirían con las reservas o la disponibilidad de  $\text{Zn}^{2+}$  puesto que requieren este metal en el sitio activo<sup>178</sup>. Nuestro grupo de trabajo ha descrito que en *Salmonella* Typhimurium, la presencia de plásmidos portando la metalo  $\beta$ -

lactamasa VIM-2 es inestable y tienden a ser perdidos por el microorganismo con el transcurso de las generaciones<sup>178</sup>

## 2.VII\_BLEE y resistencia transferible a quinolonas en Uruguay

Los primeros reportes de BLEE descritas en nuestro país se remontan a principio de los 90 y hacen referencia a derivadas de SHV en aislamientos hospitalarios<sup>179</sup>. A partir del año 1991 se aíslan cepas de EPEC provenientes de niños con diarrea con resistencia a oximinocefalosporinas<sup>180</sup>. Estas cepas presentaban PER-2, y algunos de los aislamientos tenían origen comunitario<sup>181</sup>. A mediados de los 90, se obtuvieron aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* portadores de CTX-M-2, la cual estaba codificada en un integrón complejo de clase 1, que también codificaba para resistencia a kanamicina, tobramicina y amikacina<sup>182</sup>. Las primeras evidencias de cambio en la epidemiología de las BLEE en nuestro país surgen a partir del año 2006 cuando se obtienen aislamientos de enterobacterias portadoras de CTX-M-15 y CTX-M-9 a partir de colonización rectal en pacientes internados en una UCI<sup>183, 184</sup>. En este trabajo se describen también la detección de los primeros genes de resistencia transferibles a quinolonas, correspondientes a la enzima Aac(6')Ib-cr y variantes de QnrB y QnrA<sup>183, 184</sup>. La asociación de resistencia transferible a quinolonas y BLEE se observa también en pacientes pediátricos para el año 2009 donde se detectan BLEE de tipo CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-15, SHV-2 y SHV-5<sup>185</sup>.

## 2.VIII\_ *E. coli* virulencia y resistencia a antibióticos:

En la última década se ha observado en los patógenos urinarios un paulatino aumento de la resistencia a antibióticos<sup>186, 187</sup>.

Se ha propuesto que estos aumentos determinados en un momento dado, para un lugar específico pueden deberse fundamentalmente a dos aspectos: 1-La presión de selección y eventualmente co-selección que ejerce el uso indiscriminado de determinado grupo de antibióticos 2- La diseminación de una clona particularmente resistente<sup>186</sup>. Poder discernir cuál de estos dos componentes es el preponderante en una región toma importancia en la medida que puede modificar conductas profilácticas y terapéuticas.

De particular importancia es el aumento de la resistencia a fluoroquinolonas debido, por un lado, a que es una de los grupos de drogas de primera línea en estas infecciones y, por

otro, a la reciente aparición de mecanismos de resistencia transferibles a estos antibióticos.

Por otro lado, el incremento de la resistencia a antibióticos (fundamentalmente a quinolonas) se ha asociado a menor cantidad de atributos de virulencia.<sup>188, 189</sup> Este fenómeno se ha intentado explicar o bien por la pérdida de los mismos durante el proceso de mutación que genera la resistencia<sup>190</sup> o bien por la pertenencia de las cepas resistentes a clones diferentes de las sensibles.<sup>191, 192</sup>

En ese sentido el surgimiento de clones exitosos como *E. coli* ST131, y el GCA mundialmente diseminados podría ser un ejemplo claro de coexistencia de multiresistencia y atributos de virulencia.<sup>193-196</sup>

La co-resistencia a oximinocefalosporinas (fundamentalmente mediada por BLEEs) y fluoroquinolonas en *E.coli* es un hecho creciente a nivel mundial y particularmente en Latino America<sup>197</sup>. Sin embargo, la información disponible en cuanto a la diseminación de clones y la presencia de atributos de virulencia en el continente es escasa.<sup>198, 199</sup>

En Uruguay, hasta el momento no hay información que relacione atributos de virulencia en *E. coli* con la presencia de BLEE o resistencia a fluoroquinolonas ni tampoco que determine los clones circulantes a nivel molecular.



## **3\_Hipótesis y Objetivos**

### 3.I\_Hipótesis:

Los aislamientos de *Escherichia coli* Patógena Extra Intestinal (ExPEC) portadores de BLEE y/o resistentes a fluoroquinolonas tienen una distribución clonal y presentan menor cantidad de factores de virulencia que aquellos no productores de BLEE y/o sensibles a fluoroquinolonas.

### 3.II\_Objetivos generales:

Relacionar la presencia de resistencia a antibióticos, en particular a oximinocefalosporinas y/o fluoroquinolonas con la detección de genes de virulencia de ExPEC.

Establecer si los aislamientos productores de BLEE y resistentes a fluoroquinolonas presentan relación clonal entre ellos.

### 3.III\_Objetivos Específicos

3.III.A\_Caracterizar los mecanismos de resistencia transferibles a quinolonas y oximinocefalosporinas en los aislamientos de ExPEC.

3.III.B\_Determinar si los genes codificantes de BLEE son movilizables por conjugación y caracterizar dichos plásmidos de acuerdo a grupos de incompatibilidad y presencia de sistemas de adicción.

3.III.C\_Determinar la clonalidad de los aislamientos portadores de BLEE

3.III.D\_Clasificar a los ExPEC de acuerdo al grupo filogenético al que pertenecen y determinar los genes de virulencia presentes en dichos microorganismos.

3.III.E\_Comparar la presencia de genes de virulencia entre las cepas sensibles y resistentes a quinolonas y oximinocefalosporinas.

3.III.F\_Determinar los principales secuenciotipos de los aislamientos resistentes a los antibióticos y verificar si los mismos se encuentran entre los aislamientos sensibles.

## **4\_Materiales y Métodos**

#### 4.I\_Cepas bacterianas:

Controles: para la determinación de sensibilidad a antibióticos se utilizaron como referencia con las cepas ATCC 25922 y 35218 de acuerdo a las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Para la detección de genes de resistencia se utilizaron las siguientes cepas ya caracterizadas en nuestro laboratorio:

*Salmonella enterica* serovar Derby T12  $bla_{TEM-144+}^{200}$ .

*Klebsiella pneumoniae* 836  $bla_{SHV-2+}$ ; *E.coli* 463  $bla_{CTX-M-2+}$ ; *Enterobacter cloacae* 532  $bla_{CTX-M-9}/qnrA1+$ ; *Klebsiella pneumoniae* 737  $bla_{CTX-M-8}/qnrB+$ ; *E.coli* 311  $bla_{CTX-M-15}/aac(6')Ib-cr+$  <sup>185</sup>.

Para la estimación del tamaño de los fragmentos y control de electroforesis en gel de campo pulsado, se utilizó la cepa *Salmonella enterica* serovar Braenderup H9812.

#### 4.II\_Cepas en estudio:

Se estudiaron 55 aislamientos de *E. coli* productoras de BLEE obtenidas entre el 1 de marzo de 2010 y 28 de febrero de 2011 de tres centros hospitalarios, dos de Montevideo (Hospital de Clínicas y Hospital Maciel) y uno de Colonia (CAMEC).

Treinta y seis eran de aislamientos significativos de urocultivos, 7 de hemocultivos, 5 de lesiones de piel, 3 de muestras respiratorias, dos de abscesos y dos de líquidos peritoneales.

Se incluyeron también 109 aislamientos de *E. coli* no productoras de BLEE de los mismos hospitals durante el mismo período de recolección provenientes de las siguientes muestras: 85 de orina, 8 de herida quirúrgica, 6 de hemocultivos, 2 de secreciones respiratorias, 3 de absceso, 3 de líquido peritoneal y 2 de lesiones de piel.

#### 4.III\_Identificación bacteriana, estudios de sensibilidad a antibióticos y detección fenotípica de BLEE.

La identificación bacteriana, sensibilidad a antibióticos y detección de BLEE se realizaron utilizando el sistema automatizado VITEK® 2 Compact system (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France).

Brevemente, el sistema VITEK® 2 utiliza 2 tarjetas de 64 pocillos para la identificación bacteriana y la determinación de sensibilidad a antibióticos. La tarjeta de identificación

utiliza reacciones colorimétricas que son leídas por un espectrofotómetro cada 15 minutos a diferentes longitudes de onda de luz visible para revelar los resultados de 48 pruebas bioquímicas<sup>201</sup>. Para las pruebas de sensibilidad a antibióticos, se estima el crecimiento por turbidez ante la presencia de los antibióticos como sustancias inhibidoras, comparadas contra pocillos control. Para cada antibiótico se incluyen entre 1 y 5 concentraciones de antibióticos, realizándose extrapolación en base a estimación de turbidez para los valores externos a los intervalos.

La detección de BLEE se realizó por comparación de crecimiento entre pocillos con cefotaxime, ceftazidime o cefepime solos o combinados con ácido clavulánico<sup>202</sup>.

La interpretación de los resultados se realizó de acuerdo a las recomendaciones de CLSI<sup>203</sup>.

Los valores de concentración inhibitoria mínima de ceftazidime, cefotaxime y cefepime para los aislamientos portadores de BLEE y de ciprofloxacina para todos los aislamientos estudiados, fueron confirmados por E-test (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

#### 4.IV\_Extracción de ADN:

La extracción de ADN se realizó por choque térmico. Brevemente se suspendieron tres colonias de cada microorganismo a estudiar en 200 µl de TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5 1 mM EDTA) las cuales se homogeneizaron mediante agitador. Se calentaron durante 10 minutos en baño a 100°C pasándose luego a baño de hielo por 5 minutos. Los restos celulares fueron decantados por centrifugación a 13000rpm durante 10 minutos en una microcentrífuga Hereaus Biofuge Pico. El sobrenadante fue retirado y colocado en nuevo tubo de centrífuga de 1,5 ml y congelado a -20°C hasta su utilización.

#### 4.V\_Detección de BLEE y mecanismos transferibles de resistencia a quinolonas:

En todos los aislamientos que presentaban test de BLEE positivos o la CIM a ceftriaxona y/o ceftazidime mayores a 1µg/ml se realizó búsqueda de genes codificantes de BLEE por PCR para los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>PER-2</sub> y *bla*<sub>SHV</sub> utilizando oligonucleótidos específicos de acuerdo a tabla 2.

Las reacciones de PCR se realizaron de acuerdo a lo previamente descrito<sup>181</sup> ajustando la temperatura de hibridización (annealing) de acuerdo a lo mostrado en la Tabla 2.

Brevemente, la mezcla de reacción se preparó para 25 µl de volumen final, conteniendo 2,5 µl de ADN molde, 1,25 unidades de Taq DNA polimerasa, 0,2 mM de desoxinucleótidos trifosfato, 10 mM Tris HCl (pH 8.4), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl y 0.5 mM de oligonucleótidos. El protocolo de reacción consistió en un paso de desnaturalización de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de: 95°C por 1 min, 55°C por 1 min y 72°C por 1 min, con una extensión final a 72°C por 20 min.

Se detectaron mediante PCR los siguientes genes de resistencia transferible a quinolonas: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* y *QepA* para aquellos aislamientos que presentaban un valor de CIM a ácido nalidíxico > 2 µg/ml. La detección de *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* se realizó mediante multiplex PCR de acuerdo a lo publicado previamente por Robicsek y cols<sup>204</sup> realizándose PCR individual para el resto de los genes. Para aquellas cepas que presentaron un valor de CIM a amikacina >2 µg/ml se le buscó la presencia del gen *aac* (*6'*)*Ib*, y la variante *cr* por perfil de restricción del producto de amplificación con la enzima BstF5I<sup>205</sup>. La confirmación de la presencia de la variante *cr* se realizó mediante secuenciación del producto de amplificación.

#### 4.VI\_Ensayos de conjugación plasmídica:

Los ensayos de conjugación se realizaron de acuerdo a Shin y cols.<sup>206</sup> utilizando como cepa receptora *E. coli* J53-2 (resistente a rifampicina). Brevemente se sembraron 2 o 3 colonias de las cepas donantes y receptora en 15 ml de caldo LB en tubos de centrifuga de 50 ml, los cuales se incubaron durante 3 horas a 37 °C con agitación a 200 rpm de manera de obtener un crecimiento en fase exponencial. Posteriormente se mezclaron 2,2 ml de la receptora con 0,2 ml de la donante y se dejó incubando durante toda la noche a 37°C. Los trasnconjugantes fueron seleccionados en placas de Mc Conkey lactosa suplementadas con 150 mg/l de rifampicina y 1mg/l de ceftriaxona.

Tabla 2. Primers utilizados para la detección de mecanismos de resistencia a antibióticos

Gen	Nombre	Secuencia de Primers (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Temperatura amplificación	Ref.
$\beta$ -lactamasas					
blaTEM	TemF	ATGAGTATTCAACATTTCCG	858	53	200
	TemR	CCAATGCTTAATCAGTGAGG			
blaSHV	SHVF	GGGTTATTCTTATTTGTCGC	927	52	187
	SHVR	TTAGCGTTGCCAGTGCTC			
blaCTXM	PANCTX-M-F	TTTGCATGTGCAGTACCAGTAA	543	62	207
	PANCTX-M-R	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA			
blaCTX-M-1	CTX-M-1F	CCCATGGTTAAAAAATCACTG	830	54,3	208, 209
	CTX-M-1R	ACGGCTTTCTGCCTTAGGTT			
blaCTX-M-2	CTX-M-2F	TTAATGATGACTCAGAGCATT	875	52	187
	CTX-M-2R	GATACCTCGCTCCATTTATTG			
blaCTX-M-8	CTX-M-G3F	ACCTGATTAACTACAATCCCAT	514	55,4	194
	CTX-M-G3R	ACTTTCTGCCTTCTGCTCTGGC			
blaCTX-M-9	CTX-M-G4F	GCTGGAGAAAAGCAGCGGAG	473	57,5	194
	CTX-M-G4R	GTAAGCTGACGCAACGTCTG			
blaCTX-M-8	CTX-M-8F	TGAATACTTCAGCCACACG	922	50	210
	CTX-M-8R	TAGAATTAATAACCGTCGGT			
blaCTX-M-9/14	CTX-M-9/14F	ATGGTGACAAAGAGAGTGC	841	55,4	184
	CTX-M-9/14R	TTACAGCCCTTCGGCGATG			
blaPER-2	PER-2 F	TGTGTTTTACCGCTTCTGCTCTG	900	52	187
	PER-2 R	CAGCTCAAACCTGATAAGCCGCTTG			
Resistencia transferible a quinolonas					
qnrA	QNRAF	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	516	54	211
	QNRAR	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA			
qnrB	QNRBF	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	469	56	198
	QNRBR	ACGACGCCTGGTAGTTGTCC			
qnrC	QNRCF	GGGTTGTACATTTATTGAATCG	307	50	198
	QNRCR	CACCTACCCATTTATTTTCA			
qnrD	QNRDF	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	580	51	198
	QNRDR	AACAAGCTGAAGCGCCTG			
qnrS	QNRSF	ACGACATTCGTCAACTGCAA	417	54	198
	QNRSR	TAAATTGGCACCCCTGTAGGC			
qepA	QEPAF	AACTGCTTGAGCCCGTAGAT	595	56	198
	QEPAR	GTCTACGCCATGGACCTCAC			
Aac(6')Ib	AACF	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	55	198
	AACR	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT			

#### 4.VII\_Determinación de Grupo de incompatibilidad plasmídica y de sistemás de adicción asociados a plásmidos conjugativos:

Los grupos de incompatibilidad plasmídica y los sistemás de adicción o mantenimiento relacionados a los mismos se realizaron por multiplex PCRs de acuerdo a Carattoli y cols. y Mnif y cols. respectivamente utilizando como molde ADN total de los transconjugantes obtenidos<sup>212 157</sup>. Los primers utilizados se muestran en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Primers utilizado para la determinación de los grupos de incompatibilidad plasmídica de acuerdo a Carattoli y cols.<sup>157</sup>

Sitio de amplificación	Grupo de Incompatibilidad	Nombre	Secuencia	Amplicon size (bp)	T de amplificación
parA-parB	Inc HI1	HI1 FW	5'-GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC-3'	471	
		HI1 RV	5'-TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA-3'		
iterons	Inc HI2	HI2 FW	5'-TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC-3'	644	
		HI2 RV	5'-GGCTCACTACCGTTGTCATCCT-3'		
RNAI	Inc I1-Ig	I1 FW	5'-CGAAAGCCGGACGGCAGAA-3'	139	
		I1 RV	5'-TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT-3'		
ori $\gamma$	Inc X	X FW	5'-AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT-3'	376	
		X RV	5'-TGAGAGTCAATTTTATCTCATGTTTTAGC-3'		
<i>repA,B,C</i>	Inc L/M	L/M FW	5'-GGATGAAAACATATCAGCATCTGAAG-3'	785	
		L/M RV	5'-CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG-3'		
<i>repA</i>	Inc N	N FW	5'-GTCTAACGAGCTTACCGAAG-3'	559	
		N RV	5'-GTTTCAACTCTGCCAAGTTC-3'		
iterons	Inc FIA	FIA FW	5'-CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG-3'	462	
		FIA RV	5'-GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG-3'		
<i>repA</i>	Inc FIB	FIB FW	5'-GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG-3'	702	
		FIB RV	5'-CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT-3'		
<i>repA</i>	Inc W	W FW	5'-CCTAAGAACAACAAGCCCCCG-3'	242	60
		W RV	5'-GGTGCGCGGCATAGAACCGT-3'		
<i>repA</i>	Inc Y	Y FW	5'-AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG-3'	765	
		Y RV	5'-GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT-3'		
iterons	IncP	P FW	5'-CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA-3'	534	
		P RV	5'-TCACGCGCCAGGGCGCAGCC-3'		
<i>repA2</i>	IncFIC	FIC FW	5'-GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG-3'	262	
		FIC RV	5'-TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT-3'		
<i>repA</i>	Inc A/C	A/C FW	5'-GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA-3'	465	
		A/C RV	5'-ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT-3'		
<i>repA</i>	IncT	T FW	5'-TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT-3'	750	
		T RV	5'-CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC-3'		
<i>repA</i>	IncFIIA	FIIS FW	5'-CTGTGTAAGCTGATGGC-3'	270	
		FIIS RV	5'-CTCTGCCACAACTTCAGC-3'		
RNAI	Inc K/B	K/B FW	5'-GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC-3'	160	
		K RV	5'-TCTTTCACGAGCCCGCCAAA-3'		
RNAI	Inc B/O	B/O RV	5'-TCTGCGTTCGCCAAGTTCGA-3'	159	
RNAI/ <i>repA</i>	Inc F	F <sub>repB</sub> FW	5'-TGATCGTTTAAGGAATTTTG-3'	270	52
		F <sub>repB</sub> RV	5'-GAAGATCAGTCACACCATCC-3'		



Tabla 4. Lista de primers utilizados para la detección de sistemas de edición de acuerdo a MnlI y cols.<sup>212</sup>

Gen	Nombre	Secuencia (5' → 3' )	Tamaño de amplicón	T de amplificación
<i>pemK</i>	PemK-up	AACGAGAATGGCTGGATGC	232	54
	PemK-low	CCAACGACACCGCAAAGC		
<i>ccdA ccdB</i>	CcdA-up	AGGAAGGGATGGCTGAGGT	230	54
	CcdB-low	GGTAAAGTTCACGGGAGAC		
<i>relE</i>	RelE-up	AAAAACCCGATGGCGACAG	370	57
	RelE-low	TGATAGACCAGGCGAAAAC		
<i>parD parE</i>	ParD-up	ACGGACCAGCAGCACCAG	534	58
	ParE-low	AGCCCTTGAGCCTGTCCG		
<i>vagC vagD</i>	VagC-up	GGGACCTGGATTTTGATGG	210	53
	VagD-low	GAGCAGATGTTGGTGTCTG		
<i>hok sok</i>	Hok-up	AGATAGCCCCGTAGTAAGTT	203	54
	Sok-low	GATTTTCGTGTCTAGATAAGTG		
<i>pndC pndA</i>	PndC-up	TCAATCAACCAGGGCTCT	140	52
	PndA-low	CCTCACCATCCAGACAAAA		
<i>srnB srnC</i>	SrnB-up	ACTGATTGTAGCCTCTTCTTT	171	54
	SrnC-low	CACCACTGTATTTCCCTGT		

#### 4.VIII\_Secuenciación de un plásmido portador de CTX-M-14:

La extracción plasmídica para la secuenciación se realizó a partir de un transconjugante TcE7 obtenido como fue mencionado anteriormente, utilizando el Kit QIAGEN<sup>(R)</sup> Large-Construct Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ADN plasmídico obtenido fue secuenciado en el laboratorio Genia utilizando un secuenciador más ivo Ion Torrent Systems.

Brevemente, el plásmido fue fragmentado por digestión enzimática, optimizando el tiempo de digestión para obtener una media de fragmentos en el entorno de 200 pb. Los fragmentos generados se verificaron mediante chip en un aparato 2100 Bioanalyzer system (Agilent).

Luego se procedió a realizar la biblioteca del ADN fragmentado. Posteriormente se seleccionaron los fragmentos de la biblioteca adecuados para una secuenciación de 200 pb. Se cuantificó la biblioteca y se verificó el tamaño de los fragmentos seleccionados utilizando el mismo equipo 2100 Bioanalyzer system.

Más tarde se generó el templado mediante la amplificación de la biblioteca en el Ion One Touch (Life Technologies). Se realizó el enriquecimiento de las mismas en el Ion One

Touch ES. En este punto se evaluó la calidad del templado y del enriquecimiento mediante espectrofluorometría en un fluorómetro Qubit 3.0 (Life Technologies).

Por último, se cargó un chip 314 (Life Technologies) y se programó el Ion PGM para realizar 520 flows, lo recomendado para hacer una lectura de 200 pb.

De acuerdo a lo solicitado se analizaron los datos como si fuera secuenciación de novo sin referencia en el servidor Torrent que dispone de la versión Torrent Suite 3.2.1.

Además, se utilizó el plug in Assembler 3.1.0 para el ensamblaje de los reads.

Los contigs fueron analizados y re ensamblados usando el programa Vector NTI Advance (TM) 11.0 (C) 2008 (Invitrogen Corporation). La anotación y esquema del mismo se realizó en el mismo programa.

#### 4.IX\_Determinación de grupo filogenético y detección de factores de virulencia:

La determinación del GF se determinó por multiplex PCR de acuerdo a lo descrito por Clermont y col. <sup>59</sup> (ver tabla 5) adoptando la división en sub grupos propuesta por Branger y cols. <sup>213</sup>

Brevemente, se busca la presencia de tres fragmentos de ADN de 279, 211 y 152 pb correspondientes a los genes *chuA*, *yjaA* y TSPE4.C2 respectivamente.

De acuerdo a Clermont y col. el GF A queda definido por la ausencia de *chuA* y TspE4.C2; el GF B1 queda definido por la ausencia de *chuA* e *yjaA* y la presencia de Tspe4.C2; la presencia de *chuA* e *yjaA* definen al grupo B2 y la ausencia de *yjaA* en presencia de *chuA* define al grupo D. (ver figura 16)

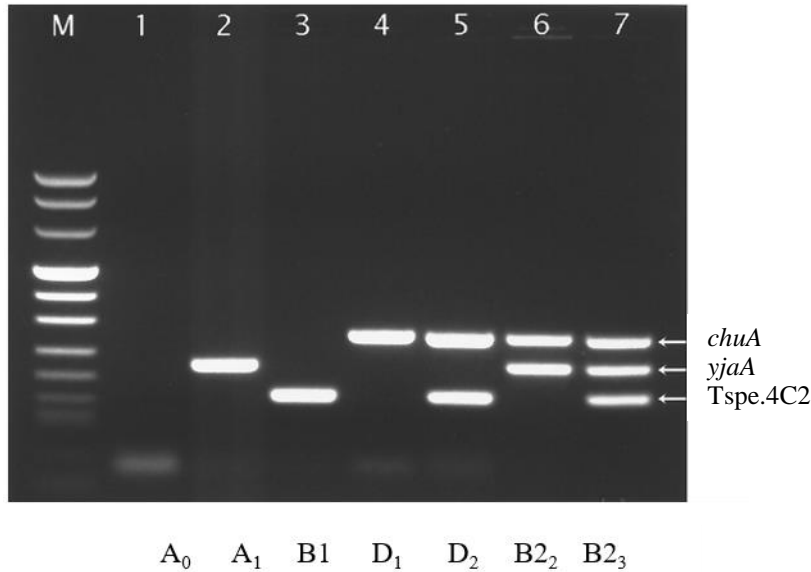
Teniendo en cuenta que para los grupos A, B2 y D se pueden obtener 2 posibles perfiles, se definieron los siguientes subgrupos:

A<sub>0</sub>: ninguna de las tres bandas presentes; A<sub>1</sub>: solo positivo *yjaA*

D<sub>1</sub>: Solo *chuA* positivo; D<sub>2</sub>: *chuA* y Tspe.4C2 positivos

B<sub>2</sub>: ; *chuA* y *yjaA* positivos; B<sub>2</sub><sub>3</sub>: *chuA*, *yjaA* y Tspe.4C2 positivos

Figura 16: se muestran las posibles variantes de la multiplex PCR para determinación de GF y la subclasificación de Branger y col. Se muestra los perfiles de bandas posibles.



La detección de los genes de virulencia se realizó en dos etapas:

En una primera instancia se realizó un tamizaje de virulencia (TV) de acuerdo a lo recomendado por Johnson y cols<sup>57</sup>. Se consideró que las cepas eran TV+ si presentaban dos o más genes de virulencia, considerando *papA* y *papC* como representantes de una sola estructura (ver tabla 5).

Para esto se realizaron dos multiplex PCR que incluían los genes *afa*, *sfa/foc*, *kpsMII* (tamizaje A) y los genes *papA*, *papC* e *iutA* (tamizaje B) en una mezcla de reacción que contenía 2 µl de ADN molde, 1,25 unidades de Taq DNA polimerasa, 0,2 mM de desoxinucleótidos trifosfato, 10 mM Tris HCl (pH 8.8) incluyendo 50 mM de KCl, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 0.6 mM de cada uno de los 6 oligonucleótidos en un volumen final de 25µl.

A aquellas cepas TV+ se les realizó la búsqueda de 19 genes de virulencia adicionales (ver tabla de primers y resultados) mediante PCR modificando lo descrito por Johnson et al<sup>6</sup> (ver Tabla 5).

Tabla 5. Primers utilizados para determinación de grupo filogenético y detección de genes asociados a virulencia

Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño de amplicón (pb)	Tiempo amplificación
<b>Grupo filogenético</b>				
ChuA	chuA1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	55
	chuA2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
YjaA	YjaA1	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	211	
	YjaA2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		
TspE4C2	TspE4C2.1	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152	
	TspE4C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG		
<b>Factores de virulencia de tamizaje</b>				

<i>papAH</i>	PapAf	ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG	720
	PapAr	CGTCCCACCATACGTGCTCTTC	
<i>papC</i>	PapCf	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	200
	PapCr	ATATCCTTCTGCAGGATGCAATA	
<i>sfa/focDE</i>	Sfa1	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410
	Sfa2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	
<i>iutA</i>	Aerf	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	300
	Aer r	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	
<i>kpsMTH</i>	kpsII f	GCGCATTGCTGATACTGTG	272
	kpsIIr	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	
<i>afa/draBC</i>	Afaf	GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC	559
	Afar	CCCGTAACGCGCCAGCATCTC	
<b>Factores de virulencia</b>			
<i>papEF</i>	papEF f	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	336
	papEFr	AGAGAGAGCCACTTATACGGACA	
<i>papG</i> II.III	pGf	CTGTAATTACGGAAGTGATTCTG	1070
	pGr	ACTATCCGGCTCCGGATAAACCAT	
<i>I</i>	pG1r	TCCAGAAATAGCTCATGTAACCCG	1190
Alelo I	alleleIf	TCGTGCTCAGGTCCGGAATTT	461
	alleleIr	TGGCATCCCCAACATTATCG	
Alelo II	alleleIIIf	GGGATGAGCGGGCCTTTGAT	190
	alleleIIr	CGGGCCCCAAGTAACTCG	
Alelo III	alleleIIIIf	GGCCTGCAATGGATTTACCTGG	258
	alleleIIIr	CCACCAAATGACCATGCCAGAC	
<i>sfaS</i>	Sfaf	GTGGATACGACGATTACTGTG	240
	sfar	CCGCCAGCATTCCTGTATTC	
<i>focG</i>	focGf	CAGCACAGGCAGTGGATACGA	360
	focGr	GAATGTTCGCTGCCATTGCT	
<i>bmaE</i>	bmaE-f	ATGGCGCTAACTTGCCATGCTG	507
	bmaE-r	AGGGGGACATATAGCCCCCTTC	
<i>gafD</i>	gafD-f	TGTTGGACCGTCTCAGGGCTC	952
	gafD-r	CTCCCGAACTCGCTGTACT	
<i>nfaE</i>	nfaEf	GCTTACTGATTCTGGGATGGA	559
	nfaEr	CGGTGGCCGAGTCATATGCCA	
<i>fimH</i>	fimH F	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	508
	fimH R	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	
<i>hlyA</i>	hlyAF	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1177
	hlyAR	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	
<i>cnf1</i>	cnf1 F	AAGATGGAGTTTCTATGCAGGAG	498
	cnf1 R	CATTCAGAGTCCTGCCCTCATTATT	
<i>fyuA</i>	fyuAF	TGATTAACCCCGCAGCGGGAA	880
	fyuAR	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	
<i>kpsMTH</i>	KpsIII f	TCCTCTTGCTACTATTCCCCCT	392
	KpsIII r	AGGCGTATCCATCCCTCCTAAC	
<i>kpsMT K1</i>	K1-fc	TAGCAAACGTTCTATTGGTGC	153
<i>kpsMT K5</i>	K5-fc	CAGTATCAGCAATCGTTCTGTA	159
<i>Rfc</i>	rfc-F	ATCCATCAGGAGGGGACTGGA	788
	rfc-R	AACCATACCAACCAATGCGAG	
<i>ibeA</i>	ibeA F	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	170
	ibeA R	TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	
<i>cvaC</i>	ColV-Cf	CACACACAAACGGGAGCTGTT	680
	ColV-Cr	CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT	
<i>traT</i>	traT-F	GGTGTGGTGCATGAGCACAG	290
	traT-R	CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	
PAI	RPAI-F	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA	930
	RPAI-R	TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	

63

63

Brevemente, se realizaron multiplex PCR para los genes PAI, *fimH*, *papEF*, *ibeA* (multiplex 1) *fyuA*, *papGIII*, K1, *hlyA* (multiplex 2) ; *focG*, *traT*, *papGII* multiplex 3) en una mezcla de reacción que contenía 2 µl de ADN molde, 2,5 unidades de Taq DNA polimerasa, 0,8 mM de desoxinucleótidos trifosfato, 10 mM Tris HCl (pH 8.8) incluyendo 50mM de KCl, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 0.6 mM de cada uno de los 8 oligonucleótidos en un volumen final de 25µl .

#### 4.X\_Tipificación por análisis de Secuencias Multi Locus (MLST)

Se realizó MLST de acuerdo a lo descrito, mediante la amplificación y secuenciación de regiones internas de siete genes de mantenimiento (housekeeping) de acuerdo al protocolo y primers especificados en la página web de MLST para *E. coli*: <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>, antes (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>)

Los genes analizados fueron

*adk* (adenilato kinasa)

*fumC* (fumarato hidratasa)

*gyrB* (DNA girasa)

*icd* (isocitrato/isopropilmalato deshidrogenasa)

*mdh* (malate deshidrogenasa)

*purA* (adenilosuccinato deshidrogenasa)

*recA* (motivo de unión a ATP/GTP de RecA)

La reacción de PCR contuvo 2,5 ml de ADN total, 20 pmol de cada primer, 200 mmol de dNPTs, 10 ul de buffer 10x y 5 unidades de Taq polimerasa en 100 ml de agua. Las condiciones de las PCR fueron: 2 min a 95°, 30 ciclos de 1 min a 95°, 1 min a la temperatura de hibridización, 2 min a 72° seguido de 5 min at 72°.

#### 4.XI\_Tipificación mediante Electroforesis en Gel de Agarosa de Campo Pulsado (PFGE).

Para la realización de la Electroforesis en gel de campo pulsado se siguió el protocolo recomendado por PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>).

A partir de cultivos en placas de Agar Tripticasa Soja suplementadas con 5% de sangre ovina durante 18 horas a 37°C se prepararon suspensiones en BSC (buffer de suspensión celular 100 mM Tris:100 mM EDTA, pH 8.0) que fueron ajustadas a una turbidez de 7,4 de Mac Farland en hielo.

Los bloques se prepararon a partir de una mezcla de 400 µl de suspensión bacteriana en BSC, 400 µl de agarosa para PFGE (Agarose LF amresco) al 1% en TE y 20 µl de una solución stock de proteinasa K a 20 mg/ml.

Posteriormente se trataron con 5 ml de buffer de lisis celular (50 mM Tris:50 mM EDTA, pH 8.0 + 1% Sarcosyl) con el agregado de 25 µl de solución stock de proteinasa K durante 2 horas a 55°C con agitación.

Los bloques fueron posteriormente lavados por cuatro veces, dos con agua mQ estéril durante 15 min a 55°C con agitación y dos con TE en las mismas condiciones.

Luego de lavados, una porción de aproximadamente 2mm<sup>3</sup> de los mismos fueron digeridos con 50 U de XbaI por muestra previo lavado con buffer de restricción 1X a 37°C durante 2 horas.

Las muestras se corrieron en un gel de agarosa (para PFGE) al 1% en buffer Tris-Borato EDTA 0,5x en un aparato CHEF DRII system (BioRad) con las siguientes condiciones: tiempo inicial 2.2 s, tiempo final 54.2 s, voltage: 200 V, tiempo de corrida 20 horas.

El gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio de 1µg/ml en agua mQ durante 30 min, realizando un paso de lavado de una hora en agua mQ.

Los geles se vieron en un trasn iluminador UV y fueron fotografiados y guardados en formato digital.

Los perfiles de bandas obtenidos fueron analizados utilizando BioNumerics fingerprinting software (Applied Maths, St-Martens-Latem, Belgium). Los dendrogramas fueron generados por unweighted pair-group method (UPGMA) utilizando medias aritméticas en base al coeficiente de similitud de Dice con un 2% de tolerancia en el posicionamiento de las bandas. Se consideró que las cepas pertenecían al mismo pulsotipo cuando presentaban una similitud igual o mayor al 85% <sup>214</sup>

#### 4.XII\_Detección de Grupo Clonal A mediante Polimorfismo Simple de Nucleótidos (SNP) para el gen *fumC*:

Se buscaron los SNP para el gen *fumC* de acuerdo a Johnson et al <sup>215</sup>, utilizando los mismos primers recomendados para MLST, para aquellos aislamientos que siendo del grupo filogenético D se les realizó MLST.

Brevemente se buscó la secuencia nucleotídica en las posiciones 270, 271 y 288 del gen *fumC*, buscando las sustituciones G270A, C271T y C288T.

#### 4.XIII\_Análisis estadísticos

Las variables numéricas y las comparaciones de medias fueron analizadas utilizando  $\chi^2$  o test exacto de Fisher's y test de Student respectivamente. Un valor de  $P < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

El riesgo relativo (RR) y el 95% de intervalo de confianza (CI 95) fue calculado utilizando métodos estándares.

La correlación entre la presencia de genes de virulencia y la resistencia a oximinocefalosporinas o fluoroquinolonas fue determinada para las cepas que fueron TV+. Para su comparación, se hicieron dos análisis, por un lado, para los 103 aislamientos TV+ y un segundo, donde solo se tuvieron en cuenta aquellos aislamientos que presentaban perfiles diferentes ya sea en su grupo filogenético, su perfil de genes de virulencia o su perfil de sensibilidad a antibióticos.

Finalmente, para diferenciar entre poblaciones bacterianas con alta o baja probabilidad de presentar resistencia a flurquinolonas u oximinocefalosporinas, se realizaron curvas ROC utilizando varios modelos de perfiles de virulencia, utilizando como variables de estado la resistencia a ciprofloxacina y la resistencia a oximinocefalosporinas y comparando las mismas mediante el análisis de área bajo la curva.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SPSS 17.0 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## **5\_ Resultados y Discusión**



## 5.I\_Determinación de fenotipos de resistencia:

La emergencia de la resistencia a antimicrobianos es un hecho alarmante a nivel mundial<sup>216</sup> que no es ajeno a ExPEC<sup>217 218</sup>.

En nuestro país los datos disponibles dan cuenta de un aumento de la resistencia a fluoroquinolonas en las *E.coli* causantes de infecciones urinarias comunitarias en adultos entre los años 1998 y 2008, pasando de 2 al 15% en 10 años <sup>219, 220</sup>

Incluso en población pediátrica donde el uso de fluoroquinolonas es restringido, se observó un 2% de resistencia a ciprofloxacina en *E. coli* productor de infecciones urinarias comunitarias en el año 2010 <sup>221</sup>.

Por su parte en Uruguay no hay estudios específicos sobre ExPEC productores de BLEE ni de los perfiles de resistencia que se asocian a estas enzimas .

En este trabajo se estudiaron 164 cepas de ExPEC que se repartieron en 29 perfiles de resistencia a antimicrobianos diferentes (ver Tabla 6). Para la realización de los perfiles de susceptibilidad se consideraron 8 antimicrobianos: ampicilina, cefalotina, oximinocefalosporinas (ceftriaxona o ceftazidime), gentamicina, amikacina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazole. Dentro de estos, 10 concentraron el 80% de los aislamientos (131 aislamientos), incluyendo 31 que fueron sensibles a todos los antimicrobianos probados. Todos los aislamientos estudiados fueron sensibles a los carbapenemes.

Para calificar a estos aislamientos como MRD se modificó levemente el criterio previamente descrito por Magiorakos et al. <sup>153</sup> Para las cepas productoras de BLEE, dado que confieren resistencia a aminopenicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación y oximinocefalosporinas (lo cuál confiere un perfil de MDR per se de acuerdo a la definición tomada como referencia), se consideran MDR cuando además presentan resistencia a algún integrante de otras dos familias de antibióticos distintas de  $\beta$ -lactámicos.

De los 28 perfiles, 12 presentaron multirresistencia, concentrando el 40,2 % de los aislamientos (66/164), mientras que siete incluían resistencia a oximinocefalosporinas y fluoroquinolonas (Tabla 6).

Tabla 6. Distribución de los 164 aislamientos de ExPEC según antibiotipo

Perfil	Antibiotipo	N	PT/ST/ BLEE(n)	Perfil	Antibiotipo	N	ST
1	<b>AKO</b> AKGNCS*	6	B/405/CTX-M-15 <sup>(4)</sup> , A/131/CTX-M-15 <sup>(1)</sup> , NT/393/CTX-M-2 <sup>(1)</sup>	16	AKNCS*	8	
2	<b>AKO</b> AKGNC	1	I/393/CTX-M-2	17	AKNC	3	
3	<b>AKO</b> AKNCS*	12	A/131/CTX-M-15 <sup>(11)</sup> , D/ND/CTX-M-15 <sup>(1)</sup>	18	AKN	3	
4	<b>AKO</b> GNCS*	12	B/405/CTX-M-15 <sup>(6)</sup> , A/131/CTX-M-15 <sup>(1)</sup> , K /ND/CTX-M-2 <sup>(1)</sup> , LL/ND/CTX-M-2, CTX-M-14 <sup>(1)</sup> , NT/ND/CTX-M-2 <sup>(1)</sup> , N/ND/CTX-M-14 <sup>(1)</sup> , D/ND/CTX-M-14 <sup>(1)</sup>	19	AKS*	10	69,73,393
5	<b>AKO</b> GNCS	2	E/ND/CTX-M-15 <sup>(1)</sup> , A/131/CTX-M-15 <sup>(1)</sup> ,	20	AK*	19	12,405
6	<b>AKO</b> GS	1	O/69/CTX-M-9 <sup>(1)</sup>	21	AGNS	1	
7	<b>AKO</b> NCS*	15	B/405/CTX-M-15 <sup>(3)</sup> , A/131/CTX-M-15 <sup>(6)</sup> , NT/ND/CTX-M-2 <sup>(2)</sup> , C/ND/CTX-M-15 <sup>(1)</sup> , I/ND/CTX-M-2 <sup>(1)</sup> , G/ND/CTX-M-14 <sup>(1)</sup> , H/ND/CTX-M-14 <sup>(1)</sup>	22	ANCS	4	
8	<b>AKO</b> NC	2	F/1158/CTX-M-2 <sup>(1)</sup> , F/3627/CTX-M-2 <sup>(1)</sup>	23	ANC	2	
9	<b>AKO</b> NS	1	J/ND/CTX-M-14 <sup>(1)</sup>	24	ANS	1	
10	<b>AKO</b> N	1	M/3555/CTX-M-8 <sup>(1)</sup>	25	AS*	11	69
11	<b>AKO</b> G	1	C/38/CTX-M-2, CTX-M-14(1)	26	A*	7	
12	<b>AKO</b>	1	L/ND/CTX-M-2, CTX-M-14 <sup>(1)</sup>	27	N	4	95
13	AKA <b>AK</b> NCS	1		28	S	1	
14	AKGN	1		29	*	31	
15	AKGS	2	ND/131/ <sup>(2)</sup>				

A: ampicilina; K: cefalotina; O: oximinocefalosporinas; Ak: amikacina; G: gentamicina; N: ácido nalidíxico; C: ciprofloxacina; S: Sulfametoxazol-Trimetoprim. PT: pulsotipo; ST: secuenciotipo.

(\*) Se señalan los 10 perfiles que concentran el 80% de los aislamientos. En rojo los perfiles que incluyen aislamientos con BLEE. En verde los perfiles que contienen aislamientos resistentes a fluoroquinolonas.

En super índice se señalan el número de aislamientos pertenecientes a esa combinación.

En sub índice se indica el número de aislamientos estudiados

Como se observa en la Tabla 7, tanto la presencia de BLEE como la resistencia a fluoroquinolonas, están significativamente asociados con resistencia a todos los otros antimicrobianos analizados.

Previamente, en nuestro país, se había demostrado una asociación entre la resistencia a fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación en aislamientos de *E. coli* aisladas de urocultivos de origen comunitario<sup>222</sup>. Por otro lado, hemos descrito que los aislamientos de enterobacterias portadoras de BLEE aisladas de muestras clínicas de niños hospitalizados se asocian a resistencia a gentamicina OR 84.5 (IC 95% 10.6-69.6) amikacina, OR 2.1 (IC 95% 1.25-3.68) trimetoprim sulfametoxazole OR 12 (IC 95% 2.66-54.2) y ciprofloxacina OR 1.5 (IC 95% 1.05-2.15)<sup>223</sup>.

Tabla 7: Asociaciones estadísticamente significativas entre los aislamientos de *E. coli* portadores de BLEE o resistencia a fluoroquinolonas y resistencia a otros antibióticos

	n	BLEE+	BLEE-	P	RR (95%IC)	CIP-R	CIP-S	p	RR (95%IC)
SXT-R	86	47	39	0.000	10.6 (4.5-24.6)	59	27	0.000	13.31 (6.1-29.1)
A-R	126					68	58	0.000	21.1 (4.9-91.5)
K-R	102					64	38	0.000	15.7 (6.2-40.0)
O-R	55					51	4	0.000	60.4 (19.5-187.3)
Ak-R	20	19	1	0.000	57.0 (7.4-441.0)	20	0	0.000	1.4 (1.2-1.6)
G-R	27	23	4	0.000	18.9 (6.1-58.6)	22	5	0.000	8.2 (2.9-22.9)
N-R	81	53	28	0.000	76.7 (17.5-335.4)				
C-R	70	51	19	0.000	60.4 (19.5-187.3)				

R: resistente, S: sensible, SXT: sulfametoxazole-trimetoprim, A: ampicilina, K: cefalotina, O: oximinocefalosporinas, Ak: amikacina, G: gentamicina, N: ácido nalidíxico, C: ciprofloxacina

A los efectos de verificar si las asociaciones detectadas para ciprofloxacina se mantenían para aquellos aislamientos BLEE negativos, se analizaron los mismos excluyendo los 55 portadores de BLEE.

En este caso, la resistencia a ciprofloxacina se asoció con resistencia a ampicilina  $p = 0,016$  OR: 6,0 (IC95% 1,23-26,03), cefalotina  $p = 0,014$  OR 3,6 (IC95% 1,24-10,27) y trimetoprim-sulfametoxazole  $p < 0,001$  OR 7,28 (IC95% 2,37- 22,32) pero no con resistencia a gentamicina y amikacina (datos no mostrados).

Si bien la asociación entre consumo previo de ciprofloxacina o cefalosporinas de tercera generación se ha asociado a infecciones por microorganismos resistentes a fluoroquinolonas y oximinocefalosporinas respectivamente <sup>222, 223</sup>, también estas asociaciones entre múltiples resistencias establecidas en este trabajo, podrían ser explicadas por fenómenos de coselección, de modo que prácticamente cualquier antibiótico utilizado favorecería la selección de microorganismos resistentes a ciprofloxacina y/o productores de BLEE.

En este sentido Vien Le y colaboradores, demostraron que el consumo de antibióticos para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio, distintos de fluoroquinolonas, se asoció al aumento de resistencia a fluoroquinolonas en el tracto digestivo<sup>224</sup>.

Recientemente hemos demostrado para una UCI, que la colonización del tracto digestivo y/o respiratorio por *Acinetobacter baumannii* está asociada al consumo de

oximinocefalosporinas y que la ocurrencia de neumonía asociada a la ventilación mecánica por dicho microorganismo se asocia a su vez a dicha colonización previa<sup>225</sup>. Esta colonización, también se cumple para infecciones por enterobacterias<sup>184</sup>. Recientemente, Seija y colaboradores, pudieron relacionar el consumo previo de ciprofloxacina con el desarrollo de ITU por *E. coli* resistente a fluoroquinolonas, pero no con el uso de otros antibióticos<sup>222</sup>, sin embargo en ese trabajo no se analizaron las colonizaciones digestivas, que podrían ser el paso previo determinante para la posterior infección.

## 5.II\_Cepas productoras de BLEE y sensibilidad a oximinocefalosporinas:

En el año 2010, tanto las normativas del CLSI, como las del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST); modificaron en mayor o menor medida sus criterios de interpretación de los resultados de sensibilidad a oximinocefalosporinas en presencia de BLEE<sup>226, 227</sup> (ver tabla 8).

Tabla 8. Cambios, diferencias y similitudes de los criterios de interpretación de la susceptibilidad bacteriana a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación.

Antibióticos	Carga disco	año 2009						año 2010/14						
		halos (mm)			MIC (mg/dl)			halos (mm)			MIC (mg/dl)			
		S≥	RI	R≤	S≤	RI	R≥	S≥	RI	R≤	S≤	RI	R≥	
CLSI	Ceftazidime	30	18	15-17	14	8	16	32	<b>21</b>	<b>18-20</b>	<b>17</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>16</b>
	Cefotaxime	30	23	15-22	14	8	16-32	64	<b>26</b>	<b>23-25</b>	<b>22</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
	Cetriaxona	30	21	14-20	13	8	16-32	64	<b>23</b>	<b>20-22</b>	<b>19</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
	Cefepime	30	18	15-17	14	8	16	32	<b>25*</b>	<b>19-24*</b>	<b>18*</b>	<b>2*</b>	<b>4-8*</b>	<b>16*</b>
			S≥	RI	R<	S≤	RI	R>	S≥	RI	R<	S≤	RI	R>
EUCAST	Ceftazidime	10	20		15	1		8	<b>22</b>		<b>19</b>	1		<b>4</b>
	Cefotaxime	5	21		18	1		2	<b>20</b>		<b>17</b>	1		2
	Cetriaxona	30	23		20	1		2	<b>23</b>		<b>20</b>	1		2
	Cefepime	30	24		18	1		8	24		<b>21</b>	1		<b>4</b>

\*Cambios introducidos recién a partir de 2014

Se señalan en negrita las modificaciones introducidas en el año 2010 con respecto al 2009.

En rojo se resaltan las principales diferencias entre CLSI y EUCAST en las nuevas normas.

La introducción de estos cambios cuantitativos en la determinación de la susceptibilidad y resistencia introdujeron también cambios cualitativos en la interpretación de los resultados. Hasta ese momento la detección de BLEE mediante métodos de tamizaje (utilizando discos de cefalosporinas de tercera generación con y sin el agregado de ácido

clavulánico) implicaba un informe de resistencia a todas las cefalosporinas independiente del resultado obtenido, tanto para medidas de halos como para la determinación de CIM. A partir de los nuevos valores de puntos de corte, la interpretación de los resultados es independiente para cada cefalosporina, que debe informarse de acuerdo al resultado obtenido para cada una.

Los aislamientos estudiados en este trabajo mostraron una CIM50 (Concentración de antibiótico que inhibe el 50% de los aislamientos) y una CIM90 (Concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento del 90% de los aislamientos) heterogénea entre las diferentes cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Así la CIM50 y CIM90 para ceftriaxona fue de 64 y 256 mg/dl y para ceftazidime y cefepime 2 y 32 mg/dl respectivamente.

De acuerdo a las nuevas pautas, tanto CLSI como EUCAST, entre el 49 y 66% de los aislamientos, podrían haber sido considerados como sensibles a alguna cefalosporina de tercera o cuarta generación. En la figura 17 se muestran la interpretación de los resultados de sensibilidad de acuerdo a las distintas pautas mencionadas.

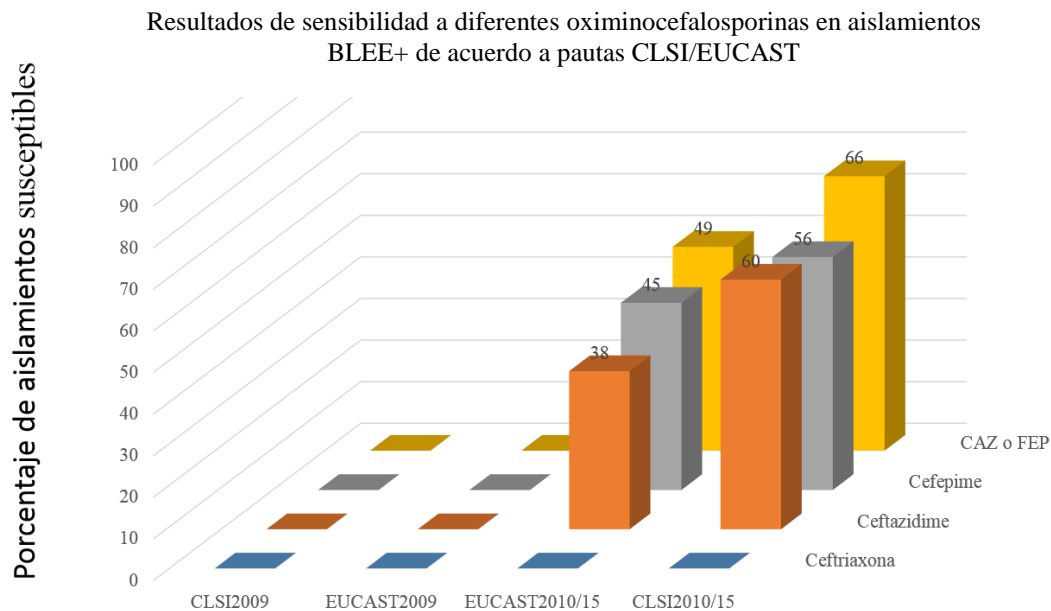


Fig. 17 Porcentajes de sensibilidad a diferentes oximinocefalosporinas de acuerdo a las pautas EUCAST y CLSI utilizando los criterios cuantitativos y cualitativos correspondientes a cada una.

Estas nuevas pautas permitirían rescatar las cefalosporinas de tercera y cuarta generación como opciones de tratamiento, evitando el uso de carbapenemes.

Sin embargo, la aceptación de estas normás es al menos controvertida. Un grupo de autores sostienen que existe literatura que muestra fallos terapéuticos en casos de infecciones por BLEE con valores dentro de la categoría “sensible”<sup>228</sup>.

Livermore y colaboradores fundamentan buena parte de su argumentación en los resultados obtenidos por Paterson y colaboradores en un trabajo del año 2001, sobre infecciones severas producidas por microorganismos productores de BLEE<sup>229</sup>.

Sin embargo, en trabajos que buscan factores de riesgo asociados a mortalidad en las infecciones producidas por microorganismos productores de BLEE o carbapenemás as, suele aparecer como riesgo independiente asociado a mortalidad, la gravedad de la infección<sup>230, 231</sup>. Por lo tanto, el fallo terapéutico en estos pacientes, podría asociarse más a la gravedad de la infección, que a la producción de BLEE propiamente dicha.

El informar de acuerdo al test de sensibilidad (incluyendo los valores de CIM en caso de tenerlos) pero destacando la presencia de BLEE en esos aislamientos, así como la participación de los infectólogos tanto en los diseños de guías terapéuticas como en los tratamientos de los pacientes con infecciones por aislamientos multi resistentes, podría ser una combinación de medidas que permitiera optimizar el uso de antimicrobianos en pacientes con infecciones por microorganismos productores de BLEE.

### 5.III\_Determinación de BLEE y RTFQ en ExPEC:

Como fue señalado previamente, se ha identificado un cambio en la epidemiología de las BLEE en nuestro país a partir del año 2006, que implica la emergencia de BLEE del tipo CTX-M-15 y CTX-M-14 entre otras<sup>184, 185, 223</sup>. Sin embargo, hasta el momento, ningún trabajo se ha centrado en *E. coli*, por lo que la información disponible es circunstancial.

En lo referente a aislamientos clínicos, se ha descrito la presencia de CTX-M-2, SHV-5 y CTX-M-15 en aislamientos pediátricos<sup>185, 223</sup>.

En este trabajo, la distribución de BLEE fue la siguiente: 37 aislamientos presentaron CTX-M-15, 8 CTX-M-2, 5 CTX-M-14, tres presentaron dos BLEE: CTX-M-2 y CTX-M-14, un aislamiento CTX-M-9 y uno CTX-M-8.

Estos 55 aislamientos se distribuyeron en 12 perfiles de resistencia independientemente del tipo de BLEE, como puede verse en la Tabla 6.

Estas BLEE se asociaron a genes de resistencia transferible a quinolonas de la siguiente manera: *aac(6')Ib-cr* fue detectado en 33 cepas, (en 31 portadoras de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y dos *bla*<sub>CTX-M-14</sub>), por su parte *qnrA* y *qnrB* fueron detectados en un solo aislamiento cada uno, asociados a *bla*<sub>CTX-M-9</sub> y *bla*<sub>CTX-M-8</sub> respectivamente.

#### 5.IV\_Tipificación Molecular y Caracterización Clonal:

Para poder determinar si estos aislamientos estaban relacionados genéticamente, se les realizó tipificación mediante Electroforesis en Gel de Campo Pulsado, la cual pudo realizarse en 51/55 aislamientos. Las 4 cepas restantes (tres productoras de CTX-M-2 y una de CTX-M-15) no fueron tipificables por éste método.

Figura 18: Pulsotipos de los aislamientos pertenecientes al clon A portadoras de CTX-M-15

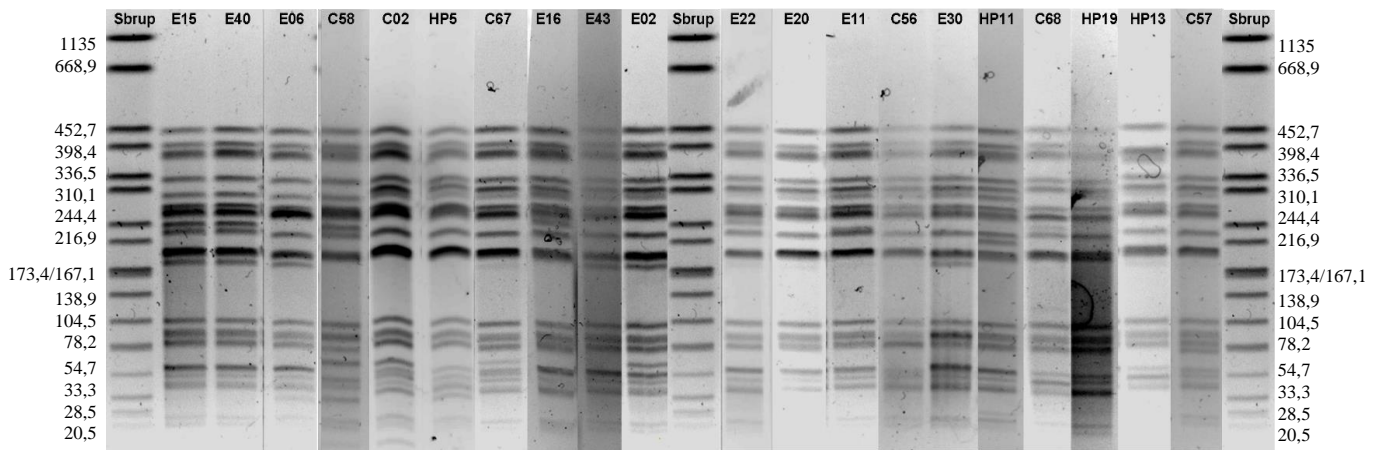
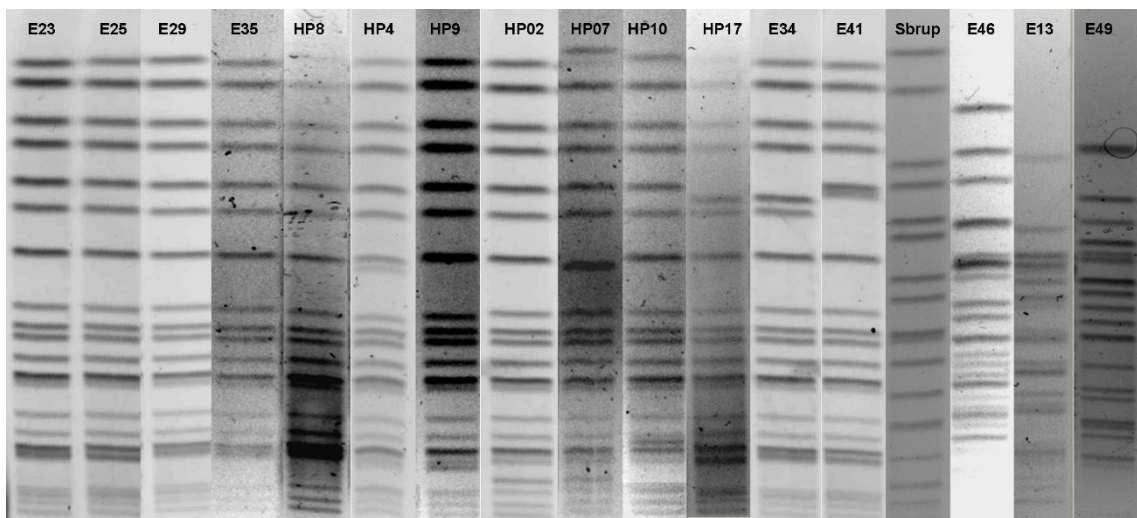


Figura 19: Pulsotipos de los aislamientos pertenecientes a los pulsotipos B, C, D y E portadoras de CTX-M-15



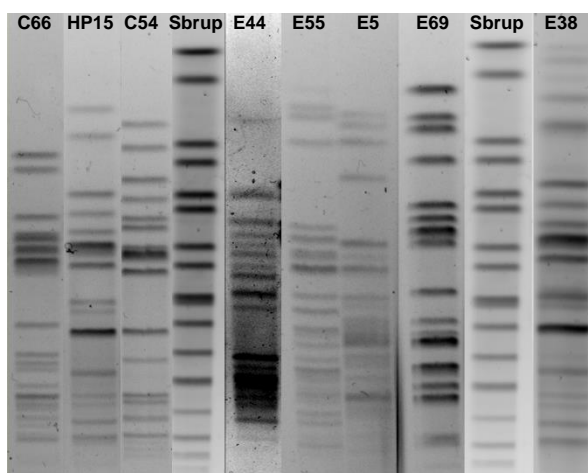
Pulsotipo B: E23, E25, E29, E35, HP08, HP04, HP09, HP02, HP10, HP17, E34, E41. Pulsotipo C: E13, Pulsotipo D: E49, Pulsotipo E: E46. Sbrup: *Salmonella* Braenderup. Los valores de los pesos moleculares de los fragmentos producto de la digestión de la *S. Braenderup* se ven en la Fig. 18



Las cepas productoras de CTX-M-15 se agruparon en 5 pulsotipos denominados de la A a la E; dos pulsotipos mayores (A y B) dieron cuenta de 20 y 13 cepas respectivamente, mientras que un solo aislamiento se encontró en los pulsotipos C, D y E (ver figuras 18,19 y 22).

Las cepas productoras de CTX-M-2, CTX-M-14, CTX-M-9 y CTX-M-8 no estaban relacionadas entre si, perteneciendo a distintos pulsotipos (ver figuras 20, 21 y 22).

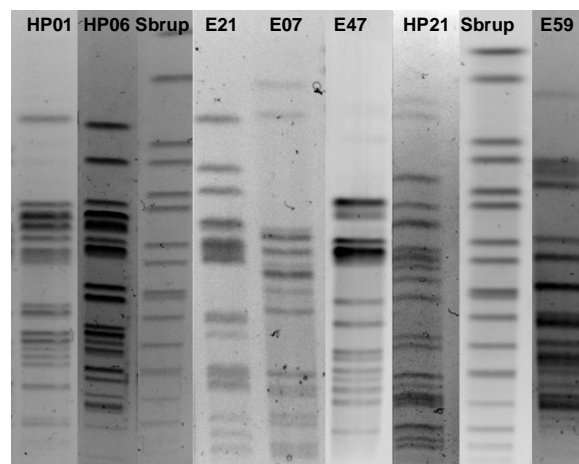
Figura 20: Electroforesis de Campo Pulsado de aislamientos portadores de CTX-M 2.



E69, C54 y C66 presentaron CTX-M-2 y CTX-M-14

Los valores de los pesos moleculares de los fragmentos producto de la digestión de la *S. Braenderup* se ven en la Fig. 18.

Figura 21: Electroforesis de Campo Pulsado de aislamientos portadores CTX-M-8, 9 y 14



HP01, HP06, E21, E07, E47: CTX-M-14; HP21: CTX-M-9; E59: CTX-M-8

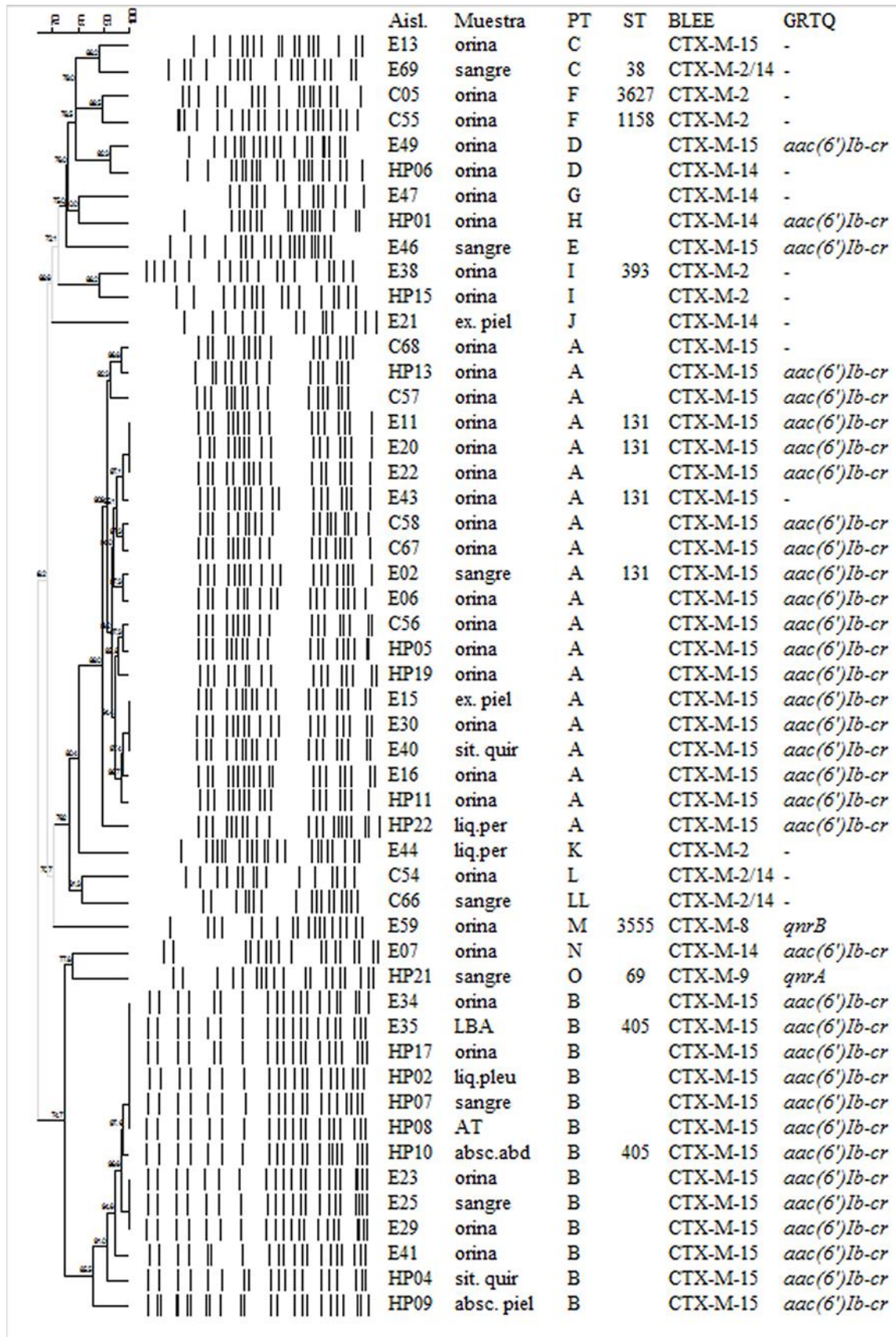
Se seleccionaron 13 aislamientos representativos de los pulsotipos más importantes para determinar su secuenciotipo ST.

El pulsotipo A perteneció al ST131 mientras que el pulsotipo B perteneció al ST405.

Las cepas pertenecientes al ST131 fueron detectadas en los tres hospitales a partir de diferentes muestras como ser sangre, orina, infección de sitio quirúrgico y líquido peritoneal.



Fig 22 Patrones de campo pulsado y principales características de los aislamientos productores de BLEE.



Por otro lado, las cepas pertenecientes al ST405 se detectaron solo en los dos hospitales de Montevideo, de muestras similares a las anteriores, donde se incluyen lavado broncoalveolar, abscesos y líquido pleural.

En un trabajo que desarrollamos simultáneamente, pudimos determinar que el ST405 es uno de los clones de *E. coli* que más frecuentemente se encuentra colonizando el tracto digestivo de los pacientes internados en UCI del Hospital de Clínicas. Precisamente en el caso del paciente portador del aislamiento E29 causante de una ITU, se encontraba internado en dicha UCI y la cepa causante de la infección colonizó su tracto gastrointestinal una vez que ingresó a la unidad y previo a causar la infección. Curiosamente, pese a que 10 aislamientos pertenecientes al ST131 provenían de dicho hospital, no detectamos este clon como colonizante, ni como causante de infección en la UCI<sup>140</sup>. Este hecho podría sugerir vías diferentes de diseminación.

Por otra parte, las cepas portadoras de CTX-M-2 pertenecieron a diferentes secuenciotipos: ST393 (dos cepas), ST38, ST1158 y ST3627, mientras que las cepas portadoras de CTX-M-9 y CTX-M-8 (un aislamiento de cada una) pertenecieron a los secuenciotipos ST69 y ST3555 respectivamente.

En la figura 22 se presenta un dendrograma de los aislamientos analizados mediante PFGE, incluyendo secuenciotipos de aislamientos seleccionados, las BLEE presentes y los GRTFQ.

### 5.V\_Detección del grupo clonal A:

Dentro de los clones descritos como epidémicos y asociados a resistencia a antibióticos se encuentra el grupo clonal A (GCA), el cual está integrado por *E. coli* pertenecientes al GF D<sup>196, 232</sup>. En el año 2004, Johnson y colaboradores describen un método para su rápida detección, basado en SNPs del gen *fumC*<sup>215</sup>. Si bien es conocido que el GCA pertenece al ST69, nos interesó saber la correlación existente entre este método y la determinación del secuenciotipo entre los clones detectados en este trabajo, a los efectos de poder realizar un tamizaje más rápido.

Dentro de los aislamientos productores de BLEE, 21 pertenecieron al GF D; 13 de ellos correspondieron al pulstipo B ST405. De los restantes ocho, se le realizó estudio de MLST y SNPs para *fumC* a siete, los cuales se distribuyeron como se muestra en la tabla

9. Un solo aislamiento (HP21) correspondiente a ST69 y portador de *bla*<sub>CTX-M-9</sub>/*qnrA*, perteneció al GCA.

Tabla 9. Correlación entre MLST y *fumC* SNPs para detectar la presencia del grupo clonal A GCA en los aislamientos de *E.coli* portadores de BLEE pertenecientes al grupo filogenético D.

MLST	No. de aislamientos	<i>fumC</i> SNPs para los residuos nucleotídicos		
		270	271	288
ST 38	1	A	T	C
<b>ST 69</b>	<b>1</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T</b>
ST 393	2	G	C	C
ST 405	13	G	C	C
ST 1158	1	A	T	C
ST3555	1	G	C	C
ST3627	1	A	T	C

En negrita se muestra el único ST compatible con el GCA de acuerdo al perfil de SNPs.

En las cepas estudiadas, se confirma el cambio epidemiológico de las BLEE antes mencionado, con CTX-M-15 como la enzima más frecuente en *E. coli* (67,3%), relegándose a un segundo lugar casi compartido a CTX-M-2 (25,5%) con CTX-M-14 (20%).

Conjuntamente con este cambio se produce la emergencia de los genes de RTFQ, fundamentalmente, *aac(6')Ib-cr* asociado a *bla*<sub>CTX-M-15</sub>.

El predominio de CTX-M-15 parecería estar relacionado con la asociación de ésta BLEE a clones exitosos circulantes como ST131 y ST405 e incluso a la capacidad de esta de ser co seleccionada con otros antibióticos<sup>199, 233</sup>. En este sentido, dependiendo de los niveles de expresión, CTX-M-15 se asocia a valores más altos de CIM de ceftazidime, comparado con otras enzimas de tipo CTX-M (como ser CTX-M-2 y CTX-M-14)<sup>233 234</sup>. Adicionalmente, la asociación de BLEE con RTFQ agrega a las fluoroquinolonas como un importante factor de co-selección. En este trabajo, se detectó la presencia de RTFQ en 37/55 cepas portadoras de BLEE (63,6%) fundamentalmente *aac(6')Ib-cr* (n=35).

Recientemente, Bartoloni y colaboradores reportaron cambios en la epidemiología de las BLEE a lo largo de los últimos 20 años en aislamientos de *E. coli* obtenidos de flora fecal de niños sanos de Bolivia<sup>235</sup>. Los autores reportan a partir del año 2005, un incremento en la prevalencia de cepas productoras de BLEE junto a una sustitución de CTX-M-2 por CTX-M de los grupos 1 (fundamentalmente CTX-M-15) y 9 (fundamentalmente CTX-

M-14)<sup>235</sup>. En Uruguay el primer reporte de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> junto a *aac(6')Ib-cr* corresponde a dos casos de colonización rectal de pacientes internados en una UCI durante 2006<sup>183</sup>

Coincidentemente, Wirtz y colaboradores reportan un incremento en la prescripción de fluoroquinolonas (fundamentalmente ciprofloxacina y norfloxacina) en 8 países de Latinoamérica, entre 1997 y 2007 donde se incluye a Uruguay<sup>236</sup>. La administración de estas fluoroquinolonas en el tratamiento de infecciones adquiridas en la comunidad extendería la presión de selección fuera del ambiente hospitalario, promoviendo la diseminación de las cepas portadoras de ambos genes.

Con respecto a la epidemiología de las enterobacterias portadoras de BLEE, Fernando Baquero y colaboradores en el año 2002 proponen el término alodémico, (del griego allos = otros, diferentes y demos = pueblo), para diferenciarlo de los términos “epidémico” (epi=sobre, y demos) y endémico (endo = dentro de y demos).

Epidémico se refiere a la acumulación de casos en un período relativamente corto de tiempo en una región determinada, que es causado por un agente en común (en el caso de las infecciones bacterianas, por un clon), que en general se disemina a partir de una fuente común o de persona a persona.

Por su parte “endémico” hace referencia a una frecuencia de casos por unidad de tiempo menor, pero mantenida, que si bien presentan un menor grado de clonalidad, aún se asume una causa común.

Finalmente alodémico hace referencia a una diseminación con alta acumulación de casos en un período relativamente corto en una determinada región (en ese sentido similar a lo epidémico), pero a diferencia de este, causado por diferentes clones, no pudiendo asignársele una fuente común<sup>237</sup>. La importancia de definir la situación de este modo, tiene que ver con el conjunto de medidas de control que es necesario implementar para disminuir la diseminación de la resistencia. Así en una situación epidémica se debe intervenir puntualmente sobre la fuente o reservorio de microorganismos y sus modos de transmisión, mientras que en una situación alodémica, las medidas deberán ser más generales, como disminuir el uso y optimizar la selección del tipo de antibiótico a prescribir<sup>237</sup>.

En nuestro trabajo se describe un comportamiento mixto de tipo alo-epidémico, donde la diseminación de CTX-M-15 se produce en base a la dispersión de dos clones exitosos,

como ST131 y ST405, mientras que la propagación de CTX-M-2 y CTX-M-14 tiene un claro comportamiento alodémico.

## 5.VI\_Transferencia plasmídica, Grupos de Incompatibilidad y Sistemás de Adicción:

Se seleccionaron 25 aislamientos, representantes de todos los pulsotipos detectados, para realizar experimentos de conjugación en fase líquida como fue previamente descrito.

A los plásmidos que pudieron ser conjugados, se les determinó el grupo de incompatibilidad y los sistemas de adicción.

En la tabla 10 se presentan los principales resultados obtenidos.

Se estudiaron ocho cepas productoras de CTX-M-2, siete productoras de CTX-M-15, cinco productoras de CTX-M-14, tres productoras de CTX-M-2 y CTX-M-14, la cepa productora de CTX-M-8 y la productora de CTX-M-9.

Se lograron tranconjugantes con los plásmidos codificantes de CTX-M-14 (5/5), dos de CTX-M-15 (2/7), uno de CTX-M-2 (1/8) y los codificantes de CTX-M-9 y CTX-M-8. En los microorganismos que portaban CTX-M-2 y CTX-M-14, se obtuvieron tranconjugantes solo con el plásmido codificante de CTX-M-14.

De este modo, las 8 *bla*<sub>CTX-M-14</sub> se encontraban en plásmidos conjugativos. Estos plásmidos fueron en general del grupo de incompatibilidad IncII y se asociaron al sistema de adicción *pndAC*. Este escenario es claramente diferente de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> que presenta una mayor diseminación debido a la dispersión de clones exitosos.

Los plásmidos IncII, IncFII, IncA/C e IncL/M, son considerados plásmidos epidémicos, debido a su asociación a genes de resistencia, fundamentalmente a  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro, como ser BLEE y cefalosporinasas plasmídicas de clase C<sup>149</sup>.

En este trabajo, CTX-M-14 y CTX-M-8 se asociaron a plásmidos conjugativos de tipo IncII. La presencia de BLEE asociadas a este tipo de plásmidos también la hemos encontrado en *Salmonella* Enteritidis portando CTX-M-14, en *S. Typhimurium* portando CTX-M-14, SHV-2 y CMY-2 y en *E. coli* productora de CTX-M-19<sup>238-241</sup>.



Tabla 10: Principales características de las cepas seleccionadas para conjugación y tranconjugantes correspondientes

Aislamiento	BLEE	Pulstipo	ST	CTX	CAZ	CIP	AK	Inc	Sistemas de adición
E5	CTX-M-2	F	ST3627	64	2	12	4		
E7	CTX-M-14	N		8	1.5	≥32	16		
TcE7	CTX-M-14	-	-	8	1.5	0.03	0.38	I1	pndAC
E13	CTX-M-15	C		64	16	≥32	4		
TcE13	CTX-M-15	-	-	24	8	.06	1	F -FIA-FIB	VagCD/ pemKI/ccdAB/srnBC
E20	CTX-M-15	A	ST131	16	16	≥32	8		
TcE20	CTX-M-15	-	-	16	8	0.12	2	F-FIA-FIB	vagCD/ pemKI/ccdAB/srnBC
E21	CTX-M-14	J		>256	0.5	1	3		
TcE21	CTX-M-14	-	-	16	2	0.015	0.5	I1	pndAC
E32	CTX-M-2	NT	ST393	128	4	≥32	≥32		
E35	CTX-M-15	B	ST405	>256	24	≥32	6		
E38	CTX-M-2	I	ST393	>256	4	≥32	24		
E44	CTX-M-2	K		48	3	≥32	1.5		
TcE44	CTX-M-2	-	-	32	3	0.015	0.125	F-FIB, A/C	hok-sok
E46	CTX-M-15	E		64	16	≥32	8		
E47	CTX-M-14	G		2	0.125	8	3		
TcE47	CTX-M-14	-	-	6	1	0.015	0.25	K, B/O	
E49	CTX-M-15	D		64	64	≥32	16		
E53	CTX-M-15	NT		8	8	≥32	32		
C54	CTX-M-2/14	L		>256	2	0.03	3		
TcC54	CTX-M-14	-	-	32	6	0.015	0.35	I1	pndAC
C55	CTX-M-2	F	ST1158	64	2	4	3		
E59	CTX-M-8	M	ST3555	8	0.5	1	6		
TcE59	CTX-M-8	-	-	2	0.75	0.015	0.125	I1	pndAC
C66	CTX-M-2/14	LL		64	16	8	2		
TcE66	CTX-M-14	-	-	12	1.5	0.015	0.25	F I1	pndAC/- hok-sok
E69	CTX-M-2/14	C	ST38	32	2	0.03	4		
TcE69	CTX-M-14	-	-	16	1.5	0.015	0.38	F I1	pndAC hok-sok
HP1	CTX-M-14	H	Nd	8	1	≥32	1		
TcHP1	CTX-M-14			8	2	0.015	0.25	I1	pndAC
HP03	CTX-M-2	NT	Nd	32	2	8	2		
HP06	CTX-M-14	D	Nd	16	1.5	8	2		
TcHP06	CTX-M-14	-	-	8	1.5	0.008	0.125	I1	pndAC
HP13	CTX-M-15	A	ST131	2	2	≥32	16		
HP14	CTX-M-2	NT	Nd	64	2	12	4		
HP15	CTX-M-2	I	Nd	32	2	≥32	4		
HP21	CTX-M-9	O	ST69	16	3	0.12	8		
TcHP21	CTX-M-9	-	-	4	1	0.03	0.25	HI1-HI2	-

En el año 2010 Mnif y colaboradores, reportan por primera vez la asociación entre una colección de *E. coli* portando BLEEs y la presencia de STA<sup>212</sup>. Se trataba de aislamientos obtenidos en Francia entre los años 1997 y 2002. Cuando analizaron la asociación entre las distintas BLEE y los STA, los autores reportan que CTX-M-15 es la BLEE asociada a mayor promedio de STA (2.13) seguido de SHV-2 con 1.17 de promedio. El promedio de STA para CTX-M-14 fue de 0.36 y sobre 4 transconjugantes de CTX-M-2 detectaron un solo STA, correspondiente a *pndAC*.

Cuando analizaron la asociación entre grupos de incompatibilidad plasmídicos y los STA, la mayor cantidad se detectan en los plásmidos IncF con un promedio global de 2.37 STA por transconjugante con un rango que osciló entre 4 para los IncF portadores de CTX-M-15 y 0.62 para los codificantes de CTX-M-14<sup>212</sup>

Por otro lado, de 16 plásmidos IncI estudiados, 15 se asociaron a *pndAC* mientras que los plásmidos portadores de CTX-M-15 se asociaron a *pemKI*, *hok-sok*, *vagCD* y *ccdAB*. Un plásmido IncF portador de CTX-M-15 también presentó *snrBC*.

En el año 2013, Mnif y colaboradores publican la asociación entre BLEE, grupo de incompatibilidad plasmídica y STA en una colección de *E. coli* aisladas en Tunez entre 1989 y 2009<sup>242</sup>. Nuevamente la mayoría de las CTX-M-15 estuvieron codificadas en plásmidos IncF, mientras que las CTX-M-14 mayoritariamente en plásmidos de grupo de incompatibilidad no tipificable de acuerdo al sistema descrito por Carattoli y colaboradores en el 2005<sup>157</sup>.

Nuevamente CTX-M-15 fue la BLEE asociada a mayor promedio de STA (1.62 por transconjugante) relacionándose fundamentalmente a *pemKI*, *hok-sok*, *ccdAB* y *vagCD*, mientras que CTX-M-14 se asoció a *pemKI* y en menor medida a *pndAC*.

Cuando se analizaron los STA en función del grupo de incompatibilidad, IncF se asoció a *pemKI*, *hok-sok*, *ccdAB* y *vagCD* mientras que IncI a *pndAC*.

En el año 2012 Doumith y colaboradores reportan los resultados de un trabajo con similares características que los anteriores, para aislamientos de *E. coli* productores de BLEE en Reino Unido entre el 2008 y 2009<sup>243</sup>. En este caso los autores encontraron STA solo asociados a plásmidos IncF, los cuales fueron *pemKI*, *hok-sok*, *ccdAB*,

*vagCD* y *snrBC*. Por otro lado solo se encontraron dos plásmidos IncII, ambos asociados a CTX-M-14, pero sin STA.

En nuestro trabajo, analizando representantes de los distintos pulsotipos, solo encontramos dos aislamientos de *E. coli* (pertenecientes a los pulsotipos A y C) que presentaban *bla*<sub>CTX-M-15</sub> asociadas a plásmidos conjugativos. En ambos casos fueron IncF y se asociaron a los STA *pemKI*, *ccdAB*, *vagCD* y *snrBC*. Si bien se encuentran algunas diferencias a lo previamente descrito, como la ausencia de *hok-sok*, se mantiene el hecho de que los plásmidos IncF se asociaron a la mayor cantidad de STA.

Por otro lado, *bla*<sub>CTX-M-14</sub> se asoció mayoritariamente a IncII portador de *pndAC*, a diferencia de lo previamente publicado y comentado arriba (ver tabla 10). En nuestro caso el promedio de STA para los transconjugantes de *bla*<sub>CTX-M-14</sub> es  $9/8 = 1.125$ , lo cual representa prácticamente el doble de lo previamente publicado para esta BLEE. Esta alta asociación a STA podría explicar en parte, el aumento de la presencia de CTX-M-14 a lo largo del tiempo en nuestro país. Anteriormente, discutíamos la importancia de la diseminación de clones exitosos en el caso de CTX-M-15, no obstante, los plásmidos conjugativos que estudiamos, portadores de esta BLEE, también presentaron mayor cantidad de sistemas de adicción. Por lo tanto, ya sea por la asociación a otras resistencias, o a clones exitosos o a la asociación a STA en los plásmidos codificantes, CTX-M-15 presenta ventajas como para poder seleccionarse tanto a nivel nosocomial como comunitario.

Esta presión de selección ejercida por los STA es intrínseca bacteriana, no relacionada al consumo de antibióticos ni a otro comportamiento humano, por lo que una vez que el gen codificante de las BLEE se integra a un plásmido de estas características asegura su permanencia en el linaje bacteriano al que llega.



## 5.VII\_Secuenciación del plásmido pEc07 codificante de CTX-M-14

Como se comentó más arriba, la diseminación de BLEE en *E. coli* ocurriría de forma mixta, por un lado la diseminación de CTX-M-15, con un componente predominantemente clonal a expensas de los secuenciotipos ST 131 y 405 y la diseminación de CTX-M-14 fundamentalmente, con un carácter alodémico mediado por plásmidos de grupo de incompatibilidad IncI1. Si bien CTX-M-2 también tiene un comportamiento alodémico, fue posible obtener transconjugantes a partir de una sola cepa (E44). Esto podría explicarse porque la conjugación en medio líquido sea poco eficiente para los plásmidos que portan esta enzima, o porque se ha producido la integración del gen al cromosoma bacteriano, o por la existencia de interferencias plásmido-cromosoma como se discutirá más adelante. En cualquier caso, en distintos países de Sudamérica donde CTX-M-2 era la enzima más prevalente, se ha reportado en mayor o menor medida un cambio epidemiológico a favor de CTX-M-14 y 15 a expensas de CTX-M-2 <sup>235 199</sup>.

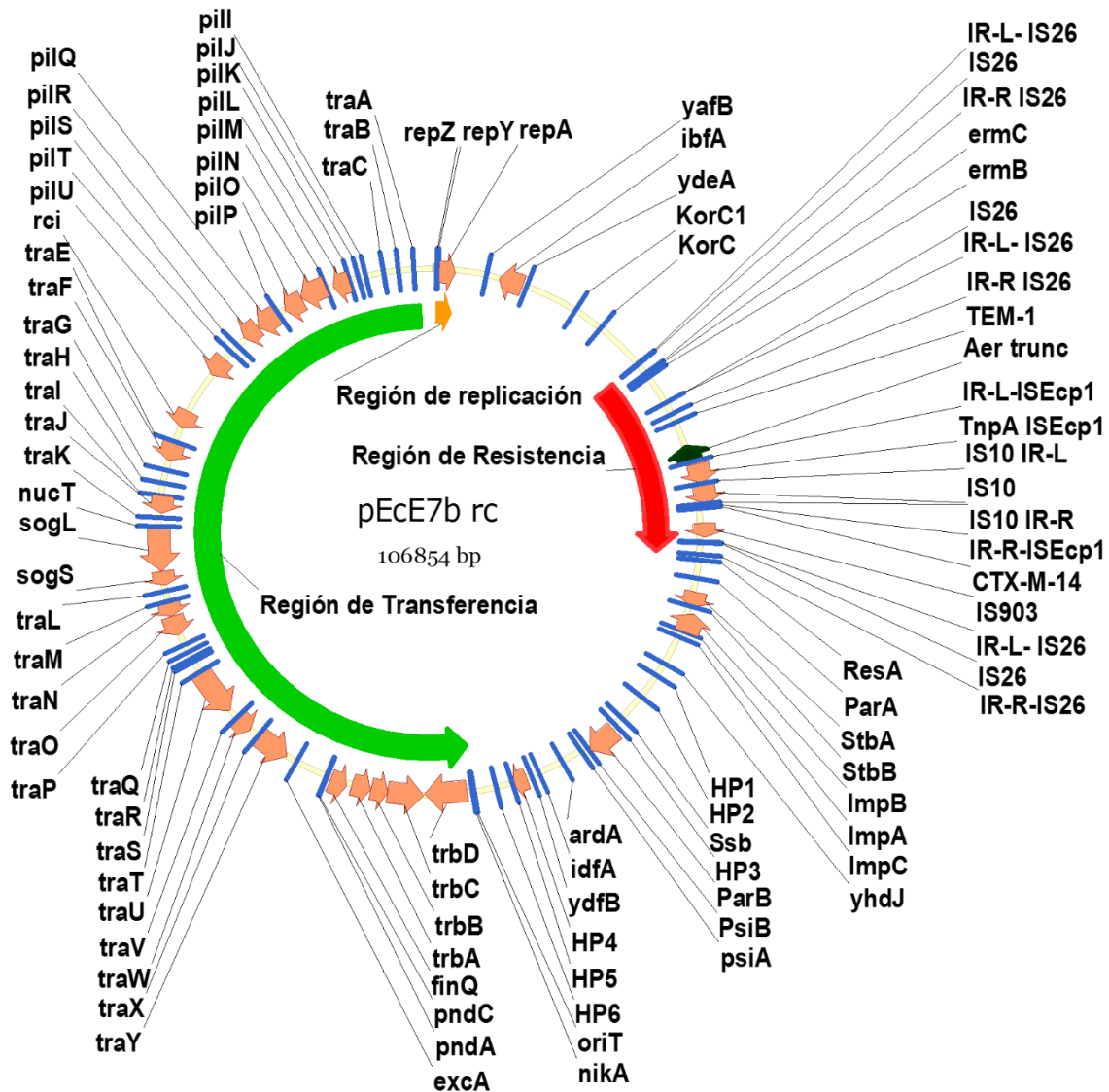
En base a estos resultados fue seleccionado un aislamiento de *E. coli* portador de CTX-M-14 (E07) en un plásmido conjugativo (pEc07), el cuál fue enviado a secuenciar.

El plásmido pEc07 presentó un tamaño de 106.854 pb. La región de transferencia estuvo constituida por 55467 pb que comprendían los cuatro componentes del aparato conjugativo descrito por Smillie y cols <sup>167</sup> dado por el origen de transferencia u *oriT*, una proteína con actividad de relaxasa que forma parte del relaxosoma, en este caso NikB, una proteína de acople entre el sistema de secreción tipo IV y el relaxosoma dada por NikA y el propio sistema de secreción tipo IV. En el caso de los plásmidos IncI el sistema de transferencia involucra la formación de dos pili, uno similar al clásico pili F codificado por los genes *tra* de estructura rígida, retráctil y hueca a través del cual se produce el pasaje de ADN de una célula a la otra <sup>244</sup>; y un segundo pili emparentado con el sistema de secreción tipo II, flexible que funciona reconociendo y uniéndose a la célula receptora en procesos conjugativos en fase líquida que se encuentran codificados por los genes *pil* <sup>245</sup> (ver figura 23).

Una vez movilizado, el destino de un plásmido luego de ingresado en una célula huésped, dependerá, por un lado, de la facilidad con que sea reconocido como ADN extraño por los sistemas de enzimas de restricción de la célula receptora o, como ya fue dicho

previamente de la presencia de STA que restringen la diseminación de progenie libre de plásmidos.

Fig. 23 Mapa genético circular del plásmido pEc07. Se señalan en rojo, verde y naranja las regiones de resistencia, transferencia y replicación respectivamente.



Para plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad (incU, IncP), se describen regiones de estabilidad, que presentan un conjunto de genes relacionados a posibilitar el mantenimiento de dicho plásmido en la célula huésped <sup>246</sup>.

Dicha región en pEc07 se encuentra interrumpida por la región de resistencia (ver más adelante), sin embargo pueden reconocerse genes codificantes de las proteínas KorC y

KorC1 las cuales son proteínas reguladoras de la estabilidad, replicación y conjugación plasmídica<sup>247</sup>; genes codificantes de ParA y ParB responsables de la segregación<sup>248</sup> y genes codificantes de StbA y StbB involucradas en la regulación de la conjugación<sup>249</sup>.

En esta región se encuentran también un sistema de inhibición y sustitución de funciones del sistema SOS. Así se encuentran los genes para PsiA y PsiB que inhiben los sistemas SOS de reparación<sup>250</sup>, mientras que ImpABC constituiría un sistema de reparación alternativo para el daño causado sobre el ADN por la exposición a rayos UV<sup>251</sup>. La presencia de PsiAB inhibiría la respuesta SOS, que se activaría en las etapas tempranas de la conjugación debido a la presencia de la copia monocatenaria del plásmido recién adquirido.

#### 5.VII.A\_Región de Resistencia (ver figura 24):

La región de resistencia presenta una extensión de 13281 pb y está constituida por: A) seis secuencias de inserción (tres copias de IS26, y una de ISEcp1, IS10 e IS903) y una versión truncada del trasposón Tn3 y B) tres genes de resistencia; *ermBC* responsable de resistencia a macrólidos, lincomicinas y streptograminas B (perfil MLSb), *bla*<sub>TEM-1</sub> responsable de resistencia a aminopenicilinas y cefalosporinas de primera generación y *bla*<sub>CTX-M-14</sub> que le agrega a la anterior, resistencia a cefalosporinas de segunda generación como cefuroxime y de tercera como ceftriaxona y ceftazidime.

Esta región de resistencia flanqueada por dos copias de IS26, podría funcionar como un trasposón compuesto, movilizándolo todo el bloque en un solo paso, desde una molécula de ADN a otra ya sea plasmídica o cromosómica.

Los primeros genes de resistencia lo constituyen *ermBC* los cuales están flanqueados por 2 copias de IS26 orientadas en sentido opuesto. Mientras que corriente arriba IS26 se encuentra tan próximo que su invertido repetido izquierdo (IR-L-IS26) constituye la región -35 de uno de los tres promotores descritos por Brisson-Noël et al <sup>252</sup>; corriente abajo, la segunda copia de IS26 se encuentra separada por una región no codificante de 1239 pares de bases (ver fig 24).

Las enterobacterias son relativamente resistentes a los macrólidos, fundamentalmente debido a la baja permeabilidad de la membrana externa, no obstante, la presencia de *ermBC* en *E. coli* fue descrita en 1988 fundamentalmente como un hecho anecdótico de transferencia de resistencia desde cocos Gram positivos a bacilos Gram negativos<sup>252</sup>.

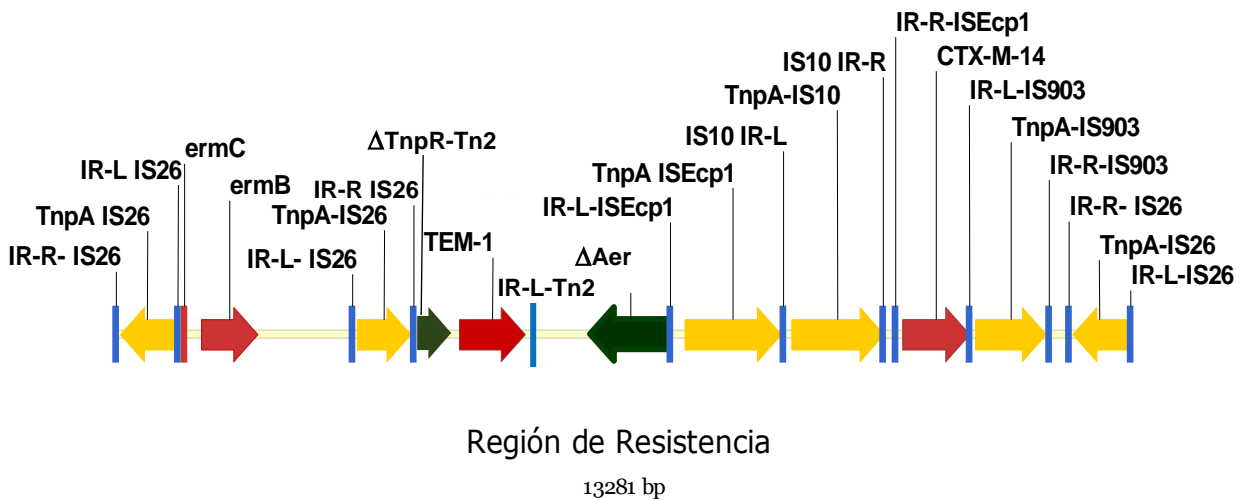


Fig. 24 Representación esquemática a escala de la región de resistencia. Se muestran en amarillo las secuencias de inserción, en azul las regiones invertidas repetidas de cada una de ellas, en rojo los genes de resistencia a antibióticos y en verde la presencia de dos pseudogenes truncados por IS26 e ISEcp1.

A diferencia de lo que ocurre en Gram positivos, que la resistencia es originalmente inducible, en Gram negativos la resistencia conferida por *ermBC* es constitutiva<sup>252</sup>.

Sin embargo a partir de la segunda mitad de los 90, comienzan a haber estudios que avalan el uso de azitromicina para el tratamiento de las shigelosis<sup>253</sup> así como los primeros reportes de *Salmonella spp*, y *E.coli* entero toxigénica (STEC) resistentes a este antimicrobiano<sup>254</sup>.

Si bien el tratamiento antimicrobiano de las diarreas producidas por *Salmonella enterica* en general no está recomendado, es importante en aquellos casos ocurridos en pacientes inmunocomprometidos, con factores de riesgo de bacteriemia, diarrea grave o signos de infección sistémica<sup>255</sup>.

Para estos pacientes, el tratamiento de elección incluye una fluoroquinolona, azitromicina o cefalosporinas de tercera generación, dependiendo del cuadro clínico<sup>255</sup>.

Recientemente hemos detectado la presencia de *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, *ermBC* y *qnrB2* en un aislamiento de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, pero alojados en diferentes plásmidos (datos no publicados). La presencia de estos genes, confieren resistencia a los tres grupos de antibióticos de elección antes mencionados.

En el plásmido pEc07 hemos detectado dos de estos genes, que como ya se ha dicho forman parte de un transposón compuesto. Si bien azitromicina no es utilizada para el tratamiento de *E. coli*, estos microorganismos actuarían como reservorio de dichos genes que podrían pasar mediante conjugación tanto a *Salmonella spp*, como a *Shigella spp*.

Como ya se mencionó previamente, la región promotora de la expresión de *ermBC* se encontraba 100% conservada con respecto a lo descrito (ver fig 25)

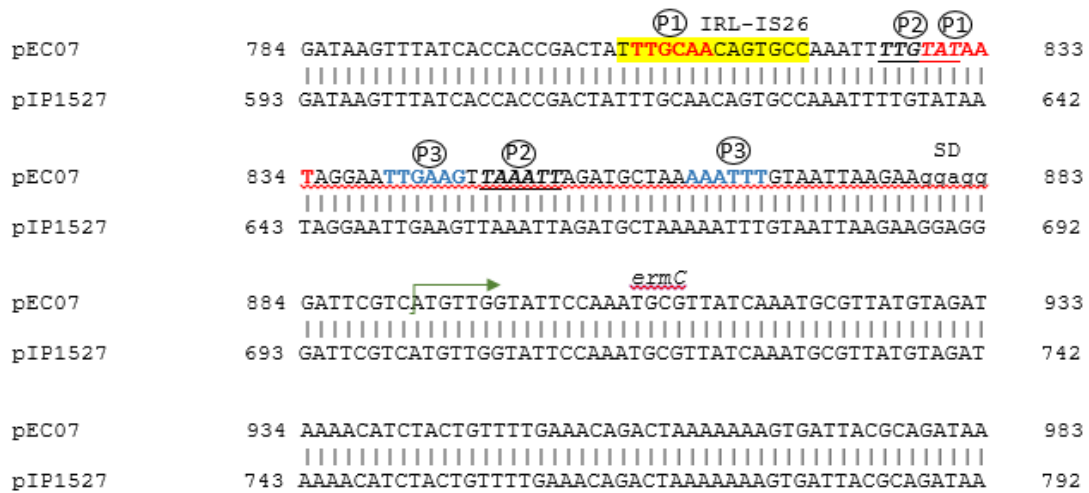


Fig. 25: Alineamiento de la región de pEc07 correspondiente a la región promotora de *ermBC* con la región de pIP1527 descrita por Brisson Noël y col.<sup>252</sup> Se muestra el invertido repetido izquierdo de IS26 (resaltado en amarillo) formando parte del promotor 1 (P1) marcado en fuente roja. El promotor 2 (P2) se señala en subrayado y el promotor 3 (P3) en fuente azul. Se señalan también la región de Shane-Delgarno (SD) y el codón de iniciación del gen *ermC*.

Para verificar que la presencia de pEc07 confiere resistencia a azitromicina, se realizó antibiograma con un disco de azitromicina de 15 µg tanto al aislamiento de *E. coli* E07, como al tranconjugante obtenido en *E. coli* J53RD<sup>R</sup> TcpEc07, así como a la cepa salvaje *E. coli* J53RD<sup>R</sup>. Los resultados se muestran en la figura 26. TcpEc07 mantuvo el mismo perfil de resistencia que E7, tanto a azitromicina como a cefalosporinas de tercera generación.

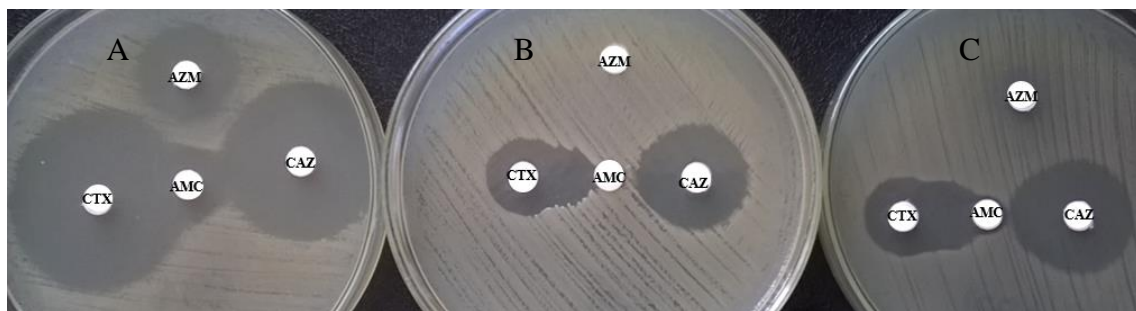


Fig. 26. Antibiograma realizado a la cepa de *E. coli* J53 (A), E7 (B) y *E. coli* J53 pEc07+ (C). Se observa la co resistencia a cefotaxime (CTX) y azitromicina (AZM) así como la sinergia entre amoxicilina clavulánico (AMC) tanto con CTX como con ceftazidime (CAZ).

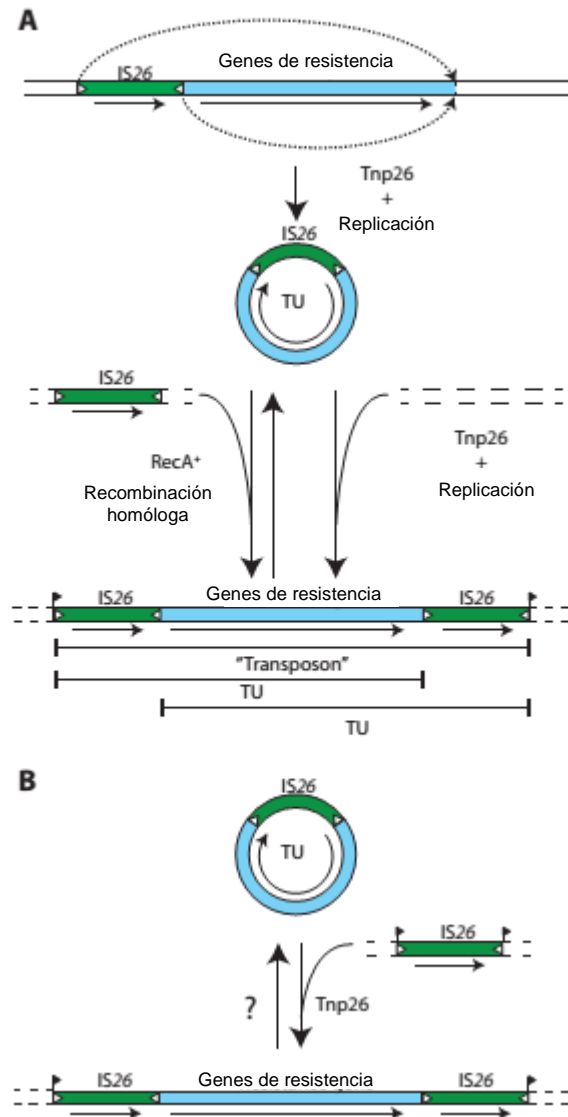
El siguiente componente de esa región lo constituye  $bla_{TEM-1}$  el cual se encuentra incluido en una copia trunca de un transposón compuesto de tipo Tn2. De esta estructura solo quedan 398pb del gen *tnpR* codificante de la transposasa, la región que incluye el promotor de la  $\beta$ -lactamasa ( $-^{35}TTCAAA$  y  $-^{10}GACAAT$ ),  $bla_{TEM-1}$  y el invertido repetido izquierdo de Tn2 (ver fig 24). Estos 1588 pb son con excepción del nucleótido que diferencia  $bla_{TEM-1}$  de  $bla_{TEM-144}$  idénticos con lo previamente reportado para TEM-144 y su entorno genético<sup>200</sup> (No de acceso: HG428760).

Sin embargo, en el plásmido pST12 portador de  $bla_{TEM-144}$ , Tn2 se encontraba completo e interrumpiendo el gen de la proteína Rom, cuyos fragmentos podían encontrarse a ambos lados del transposón<sup>200</sup>. Este hecho estaría hablando de un evento único de transposición. En el caso de pEc07,  $bla_{TEM-1}$  habría pasado por múltiples pasos de transposición, que implicarían en algún momento la movilización de un Tn2 completo, y luego la llegada de las copias de IS26. Recientemente, Harmer y colaboradores, han propuesto modelos para la inserción y desinserción de genes mediados por IS26<sup>256, 257</sup>. En estos modelos, la desinserción podría realizarse por la acción de una sola copia de Tnp26, que podría arrastrar un fragmento de ADN adyacente de la IS dando lugar a una unidad de transposición (UT). Esta UT podría luego re-insertarse ya sea por mecanismos dependientes de RecA o mediado por Tnp26 (figura 27).

La integración de la UT se produciría con una probabilidad 60 veces mayor si se realiza en una zona de ADN que ya contiene una IS26 que si no la tiene<sup>257</sup>. Este fenómeno está en línea con el concepto de “capitalismo genético” propuesto por Baquero F en el año 2004<sup>258</sup> cuándo sostenía que era más probable que ocurriera la incorporación de nuevos genes de resistencia en microorganismos que ya presentaban alguna resistencia a antibióticos.

Dado que el Tn2 se encuentra interrumpido y por lo tanto disfuncional, la movilización de  $bla_{TEM-1}$  podría haberse llevado a cabo por alguna de las copias de IS26, incluyendo una copia truncada del gen *aer*, codificante de una proteína relacionada a un receptor vinculado a quimiotaxis (ver figura 24).

Fig. 27. Vías propuestas para la movilización de Unidades de Transposición (UT) y la formación de transposones compuestos mediados por la transposasa Tnp26. IS26 y un fragmento de ADN adyacente pueden escindirse y circularizarse formando las TU. La re inserción de las TU puede producirse por recombinación homóloga mediada por RecA o por transposición replicativa mediada por Tnp26 (A), o por transposición conservativa mediada por IS26 de forma independiente de RecA (B). Tomada y modificada de Harmer y Hall 2015 <sup>256</sup>.



Entre el final trunco del gen para esta proteína y la última copia de IS26 se encuentran 4971 pb correspondientes a la BLEE CTX-M-14 y su sistema de movilización.

Este incluye a *ISEcp1* que, en este caso, contiene una copia de *IS10* insertada entre el gen codificante de la transposasa, *tnpA* y el invertido repetido derecho de la misma (IR-R-*ISEcp1*) pero sin interrumpir ninguna de las dos estructuras; el gen codificante de la BLEE *bla*<sub>CTX-M-14</sub> e *IS903* (ver figura 24).

En los primeros reportes de entornos genéticos de diferentes BLEE de la familia de CTX-M, muchas de ellas se encontraban asociadas corriente arriba a *ISEcp1*<sup>107, 259</sup> (ver figura 28 a)



De acuerdo a trabajos realizados por Poirel L y colaboradores, la presencia de *ISEcp1* sería responsable de la movilización y expresión de los distintos genes de BLEE, no jugando ningún papel la presencia de *IS903*<sup>109, 260</sup>.

La expresión de las BLEEs ubicadas corriente abajo de las *ISEcp1* estaría en buena parte mediada por la acción de una secuencia capaz de actuar como promotor, que se ubica cercano al invertido repetido derecho (IR-R) de dicha IS (<sup>-35</sup>TTGAAA; <sup>-10</sup>TACAAT)<sup>109</sup>. Como se ve en la figura 28, diferentes secuencias de inserción han sido detectadas interrumpiendo en diferentes grados a *ISEcp1*, sin embargo, en todos los casos, la región correspondiente al IR-R se mantiene intacta, manteniendo incambiada la región promotora antes descrita.

La interrupción de *ISEcp1* evita la movilización de la BLEE entre diferentes moléculas de ADN<sup>260</sup>, por lo que en los casos de entornos como se observan en la figura 28 c,d y e, dicha movilización, de ocurrir, debería estar mediada por las IS sustitutas.

Sin embargo, en los casos como los detectados en este trabajo o como se observa en la figura 28b donde se encuentran dos secuencias de inserción intactas (*ISEcp1* e *IS10*), es necesario realizar más estudios para determinar cómo influye este arreglo en las capacidades de movilización de estos transposones.

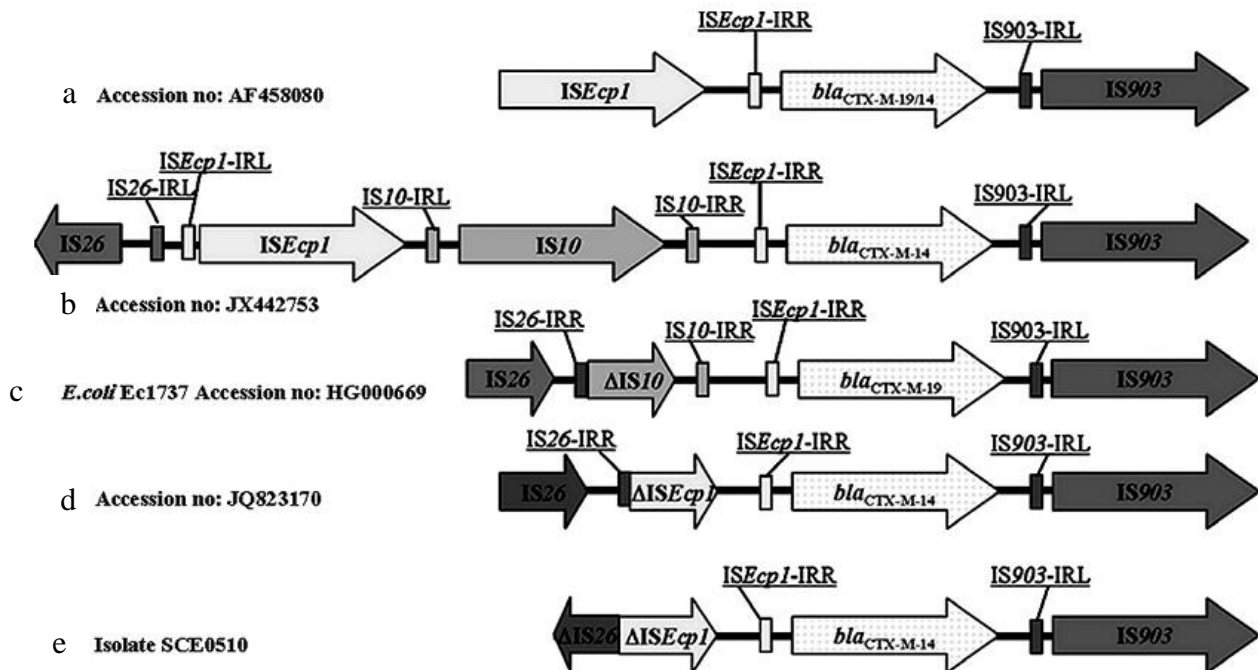


Fig. 28: Diferentes entornos encontrados asociados a las BLEE de la familia de CTX-M del grupo 4. Las puntas de las flechas indican el sentido de la transposasa de las diferentes ISs. IRL: Invertido repetido izquierdo; IRR: invertido repetido derecho. Tomada de García et al<sup>238</sup>



## 5.VIII\_Detección de Factores de Virulencia y relación con la resistencia a antibióticos

De los 164 aislamientos estudiados, 121 pertenecían a los GF B2 y D (68 al B2, 41,5% y 53 al D, 32,3%), y 43 a los GF B1 y A (23 al GF B1(14%) y 20 al A 12,2%).

Por otro lado 103 aislamientos fueron TV +, encontrándose una fuerte asociación entre pertenecer a los GFs B2 y D y ser TV+ ( $p < 0,001$ ; RR: 15,0 IC95% 6,4-35,3).

Si bien esto es lo esperable, dado que las ExPEC pertenecen mayoritariamente a los GF B2 y D<sup>6, 56-58</sup>, la relación entre ser TV+ o pertenecer a los GFs B2 y D y la presencia de resistencia a diversos antibióticos tuvieron un comportamiento completamente diferente. Así los aislamientos TV- se asociaron con resistencia a ácido nalidíxico, ciprofloxacina, gentamicina y trimetoprim sulfametoxazole, mientras que la única relación encontrada entre la pertenencia a los GFs y la resistencia a antibióticos fue entre la pertenencia a los GFs B2 y D con la resistencia a amikacina ( $p = 0,016$ ; OR=8,9 IC 95% 1,20-68,33) ver tabla 11.

Tabla 11: Relación entre la resistencia a antimicrobianos y la pertenencia a los grupos filogenéticos B2/D o ser positivo para el TV.

Resistance to	TV +[%] (n=103)	TV - [%] (n=61)				B2/D (n=121)	A/B1 (n=43)			
			P	OR	95%CI			P	OR	95%CI
Cefotaxime	29 [28,2]	26 [42,6]	0,062	1,9	0,98-3,69	39 [32,2]	16 [26,2]	0,853	1,1	0,55-2,32
Amikacin	16 [15,5]	5 [20,3]	0,23	2,1	0,71-5,94	20 [16,5]	1 [0,02]	0,016	8,9	1,20-68,33
Gentamicin	11 [10,7]	16 [26,2]	0,015	3,0	1,28-6,70	21 [17,4]	6 [0,05]	0,639	0,72	0,84-1,91
Nalidixic acid	43 [41,7]	38 [62,3]	0,015	2,3	1,20-4,40	57 [47,1]	24 [19,8]	0,601	1,24	0,63-2,48
Ciprofloxacina	32 [31,1]	38 [62,3]	<0,001	3,7	1,89-7,13	48 [39,7]	22 [51,2]	0,378	1,42	0,71-2,82
SXT	46 [44,7]	40 [65,6]	0,015	2,32	1,20-4,47	58 [47,9]	28 [65,1]	0,162	1,70	0,85-3,44

SXT: trimetoprim-sulfametoxazole

El número de genes de virulencia entre los aislamientos TV+ varió entre 3 y 16, y el promedio de genes de virulencia entre los aislamientos resistentes a cefotaxime, amikacina, ácido nalidíxico y ciprofloxacina fueron menores que sus contrapartes sensibles, como se ve en la tabla 12.

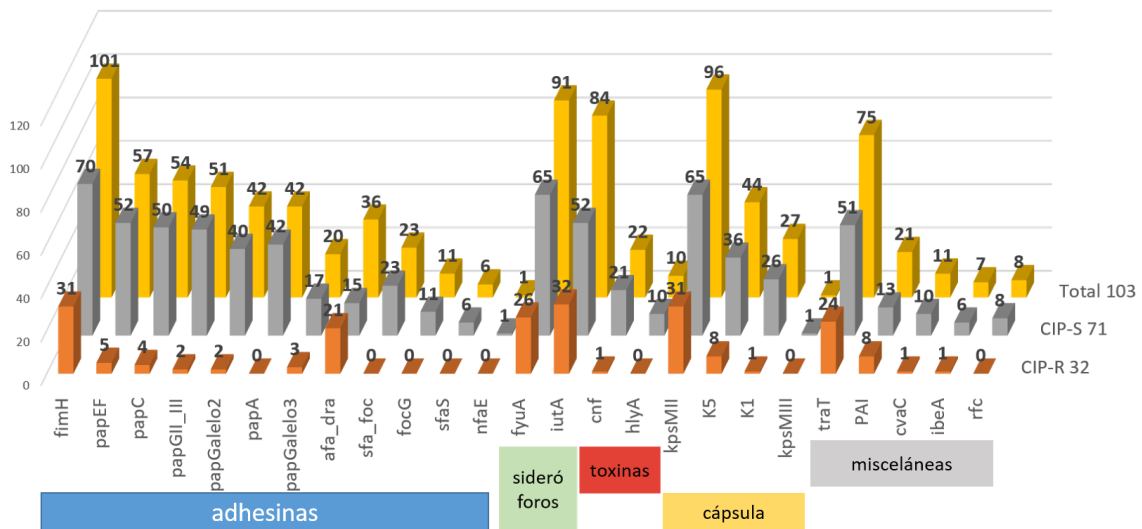
Tabla 12. Comparación de los promedios de genes de virulencia entre aislamientos susceptibles y resistentes a diversos antibióticos.

	R promedio ± DE	S promedio ± DE	p
CTX	6,3±1,7	10,1± 3,0	<0,000
AK	6,5 ± 1,3	9,4 ± 3,2	<0,000
GN	7,7 ± 3,7	9,24 ± 3,1	0,096
NAL	6,7 ± 1,9	10,9 ± 2,8	<0,000
CIP	6,1 ± 1,5	10,4 ± 2,9	<0,000

CTX: Cefotaxime; AK: Amikacina; GN: Gentamicina; NAL: Ác. Nalidixico; CIP: Ciprofloxacina.  
R promedio: promedio de genes de virulencia en aislamientos resistentes, S promedio: promedio de genes de virulencia en aislamientos

Con respecto a la detección de genes de virulencia dentro de los aislamientos TV+, los más frecuentemente detectados fueron *fimH* en 101 (98,1%), seguido de *kpsMII* 96 (93,2%), *fyuA* 91 (88,4%), *iutA* 84 (81,6%), *traT* 75 (72,8%) y *papEF* 57 (55,3%). La distribución de todos los genes de virulencia detectados puede verse en la figura 29. Las principales características de los 164 aislamientos estudiados se ven en las figuras 30 a 32.

Fig. 29: Distribución de los factores de virulencia totales y discriminados de acuerdo a la sensibilidad o resistencia a ciprofloxacina









Título: *E.coli* patógeno extra intestinal (ExPEC): Atributos de virulencia, Epidemiología Molecular y Resistencia a Antibióticos

Tabla 13. Detección de factores de virulencia en relación a la sensibilidad a fluoroquinolonas o a las cefalosporinas de tercera generación.

	Total n=103	ESBL+ n=29	ESBL- n=74	p	OR (95%CI)	CIP <sup>R</sup> n=32	CIP <sup>S</sup> n=71	p	OR (95% CI)
<i>papC</i>	54 (52.4)	4 (13.8)	50 (67.6)	0.000	4.90 (1.94-12.34)	4	50 (70.4)	0.000	16.67 (5.20-53.43)
<i>papA</i>	42 (40.8)	1 (3.4)	41 (55.4)	0.000	16.06(2.31-111.4)	0	42 (59.2)	0.000	2.45 (1.85-3.24)
<i>papEF</i>	57 (55.3)	4 (13.8)	53 (71.6)	0.000	5.19 (2.07-13.04)	5	52 (73.2)	0.000	14.80 (4.97-43.93)
<i>papGII-III</i>	51 (49.5)	3 (10.3)	48 (64.9)	0.000	6.27 (2.12-18.55)	2	49 (69.0)	0.000	33.41 (7.32-152.32)
<i>papGII</i>	42 (40.8)	3 (10.3)	39 (52.7)	0.000	5.06 (1.71-15.20)	2	40 (56.3)	0.000	19.35 (4.29-87.29)
<i>papGIII</i>	20 (19.4)	3 (10.3)	17 (23.0)	ns	-	3	17 (23.9)	ns	
<i>sfa/foc</i>	23 (22.3)	0	23 (31.1)	0.000	1.45 (1.24-1.70)	0	23 (32.4)	0.000	1.48 (1.26-1.74)
<i>sfaS</i>	6 (5.8)	0	6 (8.1)	ns		0	6 (8.5)	ns	
<i>focG</i>	11 (10.7)	0	11 (14.9)	0.031	1.18 (1.07-1.29)	0	11 (15.5)	0.016	1.18 (1.07-1.31)
<i>afa/dra</i>	36 (35.5)	19 (65.5)	17 (23.0)	0.000*	6.37(2.50-16.28)	21	15 (21.1)	0.000*	3.11 (1.86-5.20)
<i>nfaE</i>	1 (0.97)	0	1 (1.4)	ns		0	1 (1.4)	ns	
<i>fimH</i>	101 (98.1)	28 (96.6)	73 (98.6)	ns		31	70 (98.6)	ns	
<i>iutA</i>	84 (81.6)	29 (100)	55 (74.3)	0.001*	1.35 (1.18-1.54)	32	52 (73.2)	0.001*	1.37 (1.19-1.57)
<i>fyuA</i>	91 (88.3)	22 (75.9)	69 (93.2)	0.034	1.22(0.99-1.52)	26	65 (91.6)	ns	
<i>hlyA</i>	10 (9.7)	0	10 (13.5)	ns		0	10 (14.1)	0.029	1.16 (1.06-1.28)
<i>cnf</i>	22 (21.4)	1 (3.4)	21 (28.4)	0.006	8.23(1.16-58.40)	1	21 (29.6)	0.002	13.02 (1.67-101.70)
<i>kpsMII</i>	96 (93.2)	29 (100)	67 (90.5)	ns		31	65 (91.6)	ns	
<i>kpsMIII</i>	1 (0.97)	0	1 (1.4)	ns		0	1 (1.4)	ns	
<i>K1</i>	27 (26.2)	1 (3.4)	26 (35.1)	0.001	10.2(1.45-71.66)	1	26 (36.6)	0.000	17.91 (2.31-138.00)
<i>K5</i>	44 (42.8)	8 (27.6)	36 (48.7)	ns		8	36 (50.7)	0.018	3.09 (1.22-7.79)
<i>traT</i>	75 (72.8)	22 (75.9)	53 (71.6)	ns		24	51 (71.8)	ns	
<i>evaC</i>	11 (10.7)	0	11 (14.9)	0.031	1.18 (1.07-1.29)	1	10 (14.1)	ns	
<i>PAI</i>	21 (20.4)	8 (27.6)	13 (17.6)	ns		8	13 (18.3)	ns	
<i>ibeA</i>	7 (6.8)	1 (3.4)	6 (8.1)	ns		1	6 (8.5)	ns	
<i>rfe</i>	8 (7.7)	0	8 (10.8)	ns		0	8 (11.3)	ns	

Cuando se analiza la presencia de genes de virulencia en relación a la resistencia a fluoroquinolonas o cefalosporinas de tercera generación, se encuentra tres grupos de genes: los que se encuentran indistintamente en las dos poblaciones como *fimH* y *KpsMII*, los que se asocian a la población de sensibles como los genes que componen el Pili P, *sfa/foc* o *cnf* y algunos genes que se asociaron a las poblaciones resistentes, como ser *afa/dra* o *iutA* (ver figura 28 y tabla 12)

La asociación encontrada entre los genes de virulencia y la sensibilidad a antibióticos, podría estar relacionada a la circulación mayoritaria de clones exitosos como por ejemplo los aislamientos pertenecientes al secuenciotipo ST131. En este trabajo no se realizó PFGE para los aislamientos no productores de BLEE, por lo que no sabemos el impacto que puedan tener los clones que no presenten resistencia a oximinocefalosporinas.

Para disminuir el efecto de este posible sesgo, se compararon todos los perfiles de virulencia y de resistencia a antibióticos, dejando para su estudio, solo aquellos aislamientos que presentaran al menos un gen de virulencia o una resistencia a

antibióticos diferente entre sí. En este caso se analizaron 87 aislamientos, de los cuales 20 eran resistentes a ciprofloxacina y 16 presentaban BLEE.

Los análisis de las nuevas asociaciones se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Detección de factores de virulencia en relación a la sensibilidad a fluoroquinolonas o a las cefalosporinas de tercera generación, sin repeticiones

	Total n=87	ESBL+ n=16	ESBL- n=71	p	OR	CIP <sup>R</sup> VS+ n=20	CIP <sup>S</sup> VS+ n=67	p	OR
<i>papC</i>	52	4	48	0.004	6.26 (1.82-21.55)	4	48	<0.001	10.11 (3.00-34.14)
<i>papA</i>	40	1	39	<0.001	18.28 (2.29-145.97)	0	40	<0.001	2.48 (1.85-3.32)
<i>papEF</i>	55	4	51	0.001	7.65 (2.21-26.55)	5	50	<0.001	8.82 (2.78-27.92)
<i>papGII-III</i>	49	3	46	0.001	7.97 (2.07-30.65)	2	47	<0.001	21.15 (4.48-99.82)
<i>papGII</i>	40	3	32	0.025	4.72 (1.24-17.99)	2	38	<0.001	11.79 (2.53-54.94)
<i>papGIII</i>	20	3	17	ns	-	3	17	ns	-
<i>sfa/foc</i>	23	0	23	0.005	1.48 (1.26-1.74)	0	23	0.001	1.52 (1.28-1.81)
<i>sfaS</i>	6	0	6	ns	-	0	6	ns	-
<i>focG</i>	11	0	11	ns	-	0	11	ns	-
<i>afa</i>	22	6	16	ns	-	8	14	ns	-
<i>nfaE</i>	1	0	1	ns	-	0	1	ns	-
<i>fimH</i>	85	15	70	ns	-	19	66	ns	-
<i>iutA</i>	68	16	52	0.018*	1.37 (1.19-1.57)	20	48	0.005*	1.40 (1.20-1.62)
<i>fyuA</i>	75	9	66	0.001	10.27 (2.68-39.3)	14	61	0.027	4.36 (1.22-15.54)
<i>hlyA</i>	9	0	9	ns	-	0	9	ns	-
<i>cnf</i>	22	1	21	ns	-	1	21	0.019	8.67 (1.09-69.16)
<i>kpsMII</i>	80	16	64	ns	-	19	61	ns	-
<i>kpsMIII</i>	1	0	1	ns	-	0	1	ns	-
<i>K1</i>	25	1	24	0.032	7.66 (1.00-61.50)	1	24	0.01	10.61 (1.33-84.21)
<i>K5</i>	43	8	35	ns	-	9	34	ns	-
<i>traT</i>	60	10	50	ns	-	13	47	ns	-
<i>cvaC</i>	10	0	10	ns	-	1	9	ns	-
<i>PAI</i>	18	6	12	ns	-	7	11	ns	-
<i>ibeA</i>	7	1	6	ns	-	1	6	ns	-
<i>rfa</i>	8	0	8	ns	-	0	8	ns	-

En este nuevo escenario, fueron ocho los genes asociados a las cepas no portadoras de BLEE, cinco de los cuales pertenecían a la estructura del Pili P, además del operón de las adhesinas *sfa/foc*, el sideróforo *fyuA* y la presencia de cápsula de tipo *K1*. Por otra parte, estos genes más *cnf-1* codificante del factor necrozante de citotoxicidad, se asociaron a sensibilidad a ciprofloxacina.

## 5.IX\_Probabilidad de sensibilidad a fluoroquinolonas y oximinocefalosporinas en función del perfil de genes de virulencia o virulotipo:

Con estas asociaciones entre la presencia de genes de virulencia y la sensibilidad a fluoroquinolonas y oximinocefalosporinas, se intentó crear un score de virulencia que pudiera discriminar poblaciones con alta probabilidad de presentar resistencia a estos antibióticos de aquellas con alta posibilidad de presentar sensibilidad.



Para ello se construyeron curvas ROC como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos, comparando luego sus áreas bajo la curva (AUC).

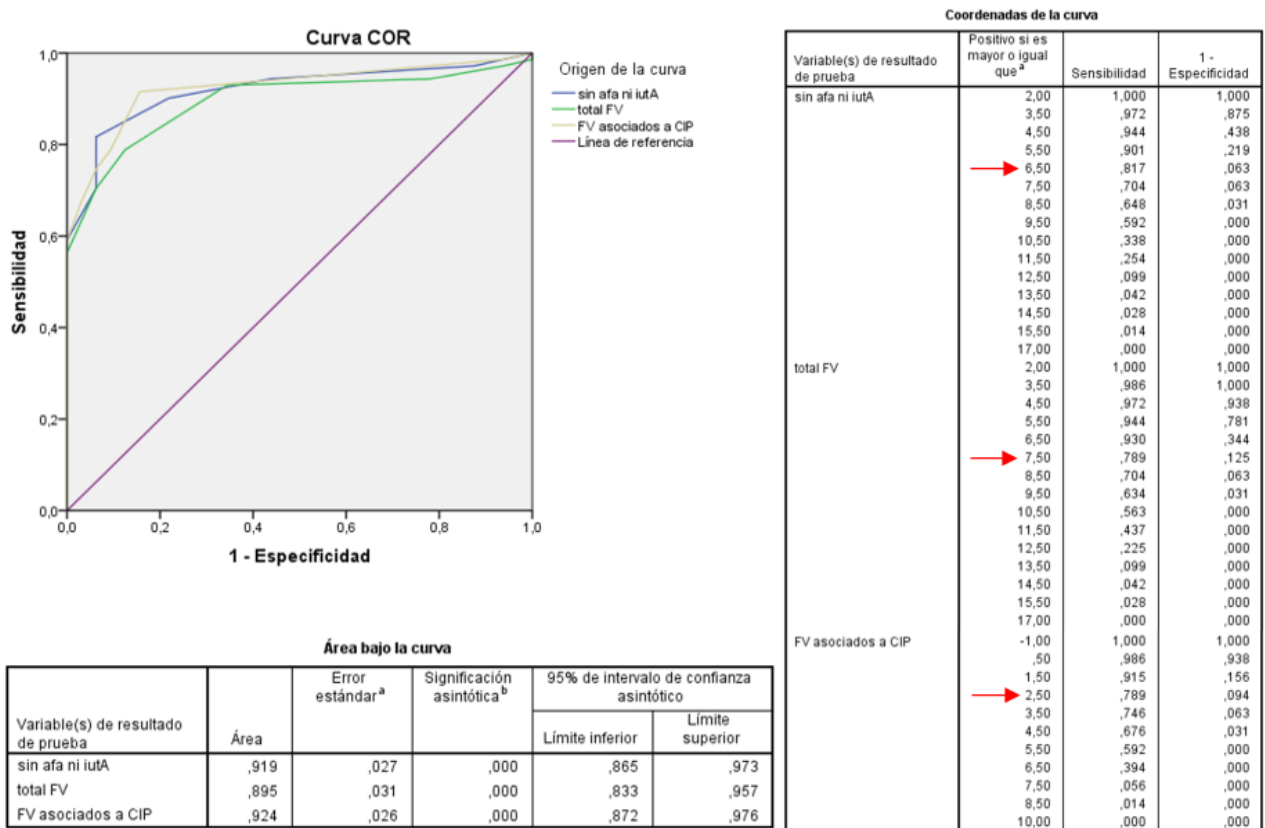
Para esto se utilizaron tres modelos para cada variable de estado: a) de acuerdo al número total de genes de virulencia detectados (GVT). Dado que, en el análisis realizado para los 103 aislamientos, se encontró que la presencia de dos genes (*iutA* y *afa/dra*) se asociaban con los aislamientos resistentes, se utilizó un modelo b) que incluía la presencia de todos los genes detectados con excepción de *iutA* y *afa/dra* GVT-2. Finalmente se utilizó un modelo c) que tenía en cuenta solo aquellas variables asociadas con la sensibilidad a cada uno de estos antibióticos denominada (GVR).

En la población estudiada, los aislamientos resistentes a ciprofloxacina fueron 32/103 (31.1%), mientras que 29/103 fueron resistentes a oximinocefalosporinas (28.2%).

El AUC ROC utilizando el modelo GVT para predecir la sensibilidad a ciprofloxacina fue de 0.895, presentando una sensibilidad del 78.9% y una especificidad del 87.5% cuando se consideró la presencia de 8 genes de virulencia o más (ver figura 33). Bajo estos parámetros, dentro de los aislamientos con 8 o más genes de virulencia, la resistencia a ciprofloxacina fue del 6.7% (4/60) mientras que dentro de los que presentaron 7 GV o menos, la resistencia fue del 65.1% (28/43). Los valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) de los tres modelos para ciprofloxacina pueden verse en la tabla 15. El VPP representa el porcentaje de cepas sensibles entre los que presentan 8 o más genes de virulencia, mientras que el VPN representa el porcentaje de resistentes entre los que presentan menos de 8 genes.



Figura 33: Características de las curvas ROC de los tres modelos de acuerdo al contenido de genes de virulencia para la sensibilidad a ciprofloxacina.



Se muestran las coordenadas de las mismas y el área bajo la curva con sus desvíos estándares. Las flechas rojas indican los puntos de corte establecidos para cada modelo, expresándose en las columnas siguientes la Sensibilidad y 1- Especificidad para cada punto de corte.

Cuando se utiliza el modelo GVT-2, el área bajo la curva fue de 0.919, con una sensibilidad del 81,7% y una especificidad del 93,8% para predecir la sensibilidad a ciprofloxacina cuando se considera la presencia de 7 factores de virulencia o más. De este modo, las cepas que portaban 7 o más genes, fueron fundamentalmente sensibles a ciprofloxacina 58/60 representando la resistencia un 3.3%. Contrariamente las cepas que portaban hasta 6 genes de virulencia mostraron una resistencia a ciprofloxacina del 69.8% (30/43). Los principales datos de la curva ROC se ven en la figura 33 y los VPP y VPN se ven en la tabla 15.

Finalmente, el AUC ROC utilizando el modelo GVR fue de 0.930, la sensibilidad fue del 78.9% y la especificidad del 90.6% cuando se considera tener 3 o más GV. La resistencia a ciprofloxacina en esta población fue de 5,1% mientras que en aquellos con menos de 3 GV fue de 65.9%.

Los resultados del análisis de las curvas ROC y los valores de VPP y VPN se ven en la figura 33 y en la tabla 15.

Tabla 15 Valores predictivos positivos y negativos (VPP y VPN) de la detección de sensibilidad/resistencia a ciprofloxacina y cefotaxime utilizando los 3 modelos de GV.

Ciprofloxacina				
GVT	S	R	Total	
GV + (>7)	56	4	60	VPP= 93.3%
GV - (≤7)	15	28	43	VPN= 65.1%
Totales	71	32	103	
GVT-2				
GVT-2	S	R	Total	
GV + (>6)	58	2	60	VPP=96.7%
GV - (≤6)	13	30	43	VPN=69.8%
Totales	71	32	103	
GVRS				
GVT-2	S	R	Total	
GV + (>2)	56	3	59	VPP=94.9%
GV - (≤2)	15	29	44	VPN=65.9%
Totales	71	32	103	

Cefotaxime				
GVT	S	R	Total	
GV + (>7)	55	5	60	VPP= 91.7%
GV - (≤7)	19	24	43	VPN= 55.8%
Totales	74	29	103	
GVT-2				
GVT-2	S	R	Total	
GV + (>6)	57	3	60	VPP=95.0%
GV - (≤6)	17	26	43	VPN=60.5%
Totales	74	29	103	
GVRS				
GVT-2	S	R	Total	
GV + (>2)	66	4	70	VPP=94.3%
GV - (≤2)	8	25	33	VPN=75.8%
Totales	74	29	103	

GVT: Genes de Virulencia Totales, GVT-2: Genes de Virulencia Totales con excepción de *iutA* y *afa/dra*, GVRS: Genes de Virulencia Relacionados a Sensibilidad. S: sensible, R: resistente, VPP: Valor Predictivo Positivo, VPN: Valor Predictivo Negativo.

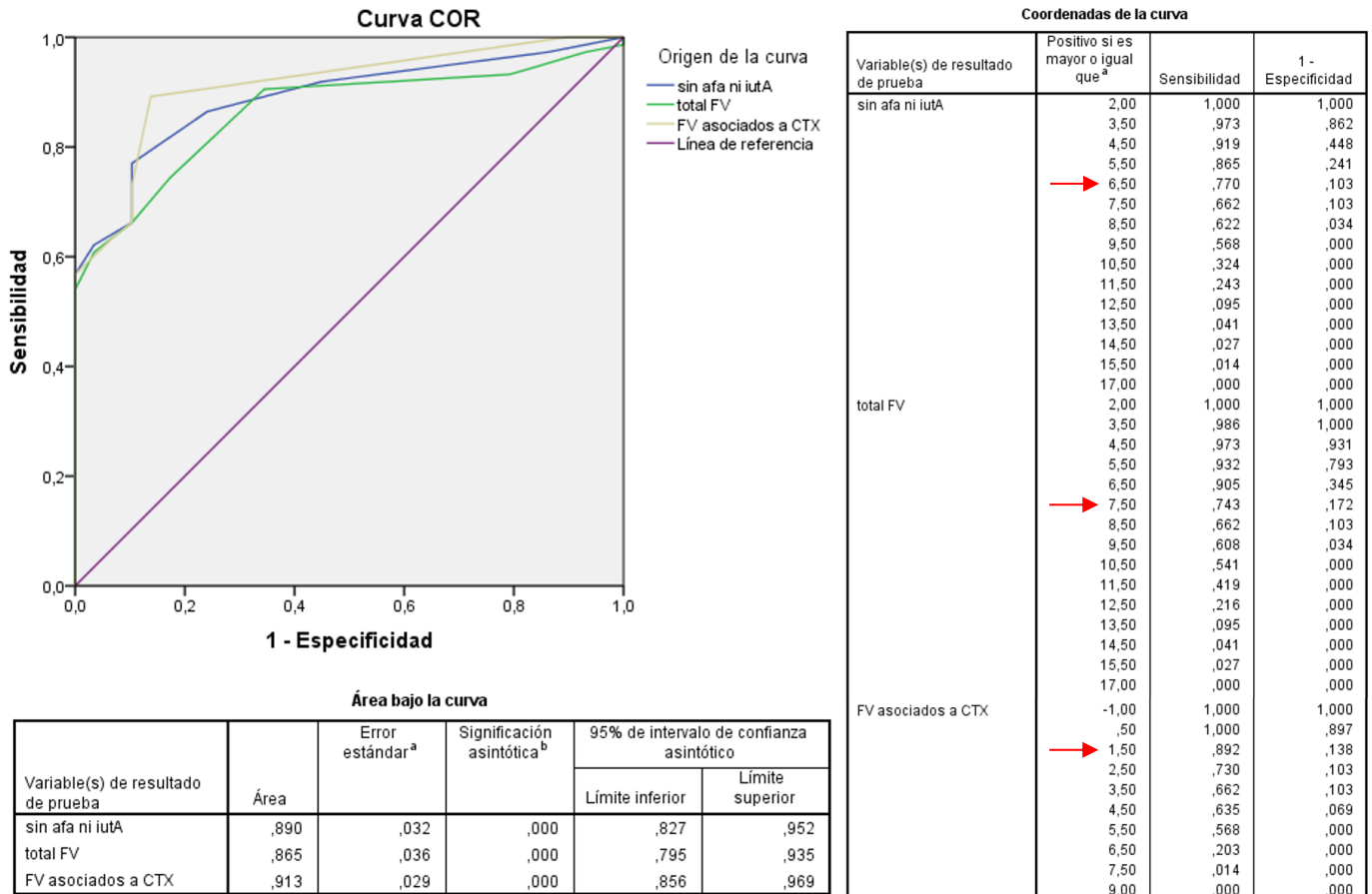
Cuando se analizaron los modelos de GV en relación a la sensibilidad/resistencia a ceftriaxona, los resultados son similares, aunque levemente menores que para ciprofloxacina, con excepción del VPN para GVRS que es 75.8%, lo cual corresponde al porcentaje de resistentes en aquellos que presentan menos de dos genes de los asociados con sensibilidad a CTX. Los valores obtenidos para CTX se observan en la tabla 15 y la figura 34.

De todos modos, es posible utilizando por ejemplo el modelo GVT-2 para cefotaxime y ciprofloxacina, separar una población donde la resistencia a cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolonas sea tan baja como el 5 y el 3,3% respectivamente. Dado que estos valores tienen que ver con el VPP, y este constituye un parámetro variable de los test diagnósticos (dependientes de las prevalencias) sería necesario probar estas estrategias para diferentes poblaciones donde las resistencias sean variables.

La utilización de una estrategia diagnóstica que implique la amplificación de 23 genes como es el modelo GVT-2, no aparece como muy implementable. Sin embargo, la amplificación de 8 o 9 genes como los modelos GVRS que podrían implementarse como

dos multiplex en real time PCR, podría ser una buena aproximación a un diagnóstico presuntivo de sensibilidad a dos familias de antibióticos ampliamente utilizados en la práctica clínica.

Figura 34: Características de las curvas ROC de los tres modelos de acuerdo al contenido de genes de virulencia para la sensibilidad a cefotaxime.



Las flechas rojas indican los puntos de corte establecidos para cada modelo, expresándose en las columnas siguientes la Sensibilidad y 1- Especificidad para cada punto de corte.

## 5.X\_Secuenciotipos (ST) en aislamientos con alto contenido de GV no relacionados a resistencia a fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación.

Hasta el momento encontramos asociaciones significativas entre el promedio y la presencia de algunos GV y la sensibilidad tanto a fluoroquinolonas como a oximinocefalosporinas. Adicionalmente, la presencia de determinada cantidad de genes, permite establecer una población bacteriana que presenta una proporción baja de resistencia a estos antibióticos. Sin embargo, surge el interrogante de si esta diferencia de poblaciones obedece a la existencia de diferentes clones, o si los mismos clones se presentan con diferente capital de GV en las cepas resistentes.

Dada la alta proporción de aislamientos pertenecientes a los GF B2/3 y D/1 y D/2 que presentaban BLEE y resistencia a ciprofloxacina se tomaron cinco aislamientos del GF B2/3 y tres del D (dos D/1 y uno D/2) con alto contenido de GV y sin resistencia a oximinocefalosporinas ni fluoroquinolonas, para determinar su ST y compararlos con los resistentes. Dentro de los 5 aislamientos B2/3 se tomaron dos provenientes de heridas, incluyendo uno de herida quirúrgica, (aquellos con mayor cantidad de genes de virulencia) y tres de urocultivo; también ubicados dentro de los que tenían mayor capital de GV (ver fig. 30). Los resultados de los ST pueden verse en la figura 30.

Los dos aislamientos con mayor número de GV (16) uno proveniente de urocultivo y otro de herida quirúrgica pertenecieron a los ST12 y 73, mientras que el segundo aislamiento de herida, perteneció al ST95. Ninguno de estos tres ST fueron detectados en los aislamientos resistentes. Sin embargo, los dos aislamientos provenientes de urocultivo, que presentaban 14 GV pertenecieron al ST131 (ver figura 30). Este capital de GV representa el doble de los que presentan las cepas ST131 portadoras de BLEE y resistencia a fluoroquinolonas (entre 6 y 8 GV).

Por otro lado, los aislamientos pertenecientes a los GF D, que no presentaban resistencia, pertenecieron a los ST69 y 405, (ver figura 31). El aislamiento perteneciente al ST405 presentaba 8 GV, mientras que los ST405 portadores de BLEE y resistencia a fluoroquinolonas, no pasaron el tamizaje de virulencia. Por su parte los aislamientos pertenecientes al ST69, tanto el aislamiento portador de BLEE, como los dos no

portadores, fueron sensibles a ciprofloxacina. En estos casos, los no portadores de BLEE presentaron 12 GV contra 10 del productor de CTX-M-9.

En este trabajo pudimos discriminar dos poblaciones de ExPEC con probabilidades claramente diferentes de presentar resistencia a fluoroquinolonas u oximinocefalosporinas de acuerdo a su capital genético en GV, ya sea en base a la detección de un amplio número de genes de virulencia, como a la presencia de un sub grupo de genes.

En ambos casos se pudieron diferenciar incluso cepas que pertenecieron al mismo secuenciotipo pero que presentaban virulotipos diferentes y también sensibilidad diferente a ciprofloxacina y oxyiminocefalosporinas.

Actualmente se reconocen algunos clones pandémicos dentro de las ExPEC, destacándose los ST131, ST393, ST69, ST95, ST73<sup>261,262</sup>. Estos clones son responsables de un grupo importante de infecciones del tracto urinario y del torrente sanguíneo, independientemente de su asociación o no a resistencia a antimicrobianos<sup>261,262</sup>. Algunos de estos clones como el ST131 y el ST69 juntos con otros como el ST405 son reconocidos, además, por su asociación a clones pandémicos multirresistentes.

En nuestro trabajo, entre los aislamientos que no presentaban resistencia a antibióticos, se analizaron solamente ocho a nivel de ST, perteneciendo siete de ellos a los clones pandémicos ST73, ST95, ST69, ST131 y ST405.

Por otro lado, cuando se analizaron los aislamientos portadores de BLEE nos encontramos con dos escenarios diferentes: por un lado, los aislamientos portadores de CTX-M-15 que se concentraron fundamentalmente en los clones ST131 y ST405; por otro, los otros grupos de CTX-M. En este último caso, detectamos una distribución alodémica, que incluye algunos clones internacionales como ST69 y ST393 y otros ST que probablemente corresponda a aislamientos locales o regionales. Históricamente, ST393, es uno de los clones más antiguamente reportados, asociados a ExPEC<sup>262</sup>. Coincidentemente con eso, nosotros encontramos ST393 portando CTX-M-2, que como ya fue dicho es una de las primeras BLEE reportadas en la región<sup>263</sup>.

En este sentido, el cambio epidemiológico que se observa a nivel regional del tipo de BLEE, podría estar relacionado a un cambio general, de clones circulantes, independientemente de la presencia de resistencia<sup>199,235</sup>.

Sin embargo, en este trabajo se encontró un capital de GV diferentes entre los microorganismos sensibles y los resistentes, incluso dentro de los mismos clones.

Durante mucho tiempo, se manejaron dos hipótesis en relación al origen de los aislamientos resistentes de UPEC-ExPEC: por un lado que las variantes resistentes a ciprofloxacina perdían GV en la medida que adquirirían la resistencia<sup>188-190</sup> y por otro que la resistencia a fluoroquinolonas, era un fenómeno independiente de la virulencia, y que eventualmente estos aislamientos no eran realmente UPEC o ExPEC, sino que pertenecían a variantes no patógenas<sup>192, 264</sup>.

Curiosamente, la presencia de algunos GV parecen ser un verdadero impedimento para que un clon que adquiere resistencia, pueda consolidarse y diseminarse.

En este sentido, la presencia de algunos factores de virulencia, como la cápsula de tipo K1, ha sido asociada a la ausencia de algunos marcadores de resistencia, como ser la presencia de integrones de clase 1<sup>265</sup>. Coincidentemente, la cápsula K1 es uno de los factores de virulencia que nosotros encontramos, junto con el pili P, *sfa/foc* y *fyuA* asociado a sensibilidad tanto a fluoroquinolonas como a oximinocetatos.

Es posible plantear algunas hipótesis para explicar estos fenómenos.

Muchos mecanismos de resistencia a antibióticos, han sido relacionados a un mayor costo biológico o a la denominada pérdida de fitness en diferentes poblaciones bacterianas<sup>175</sup>. Diard et al. recientemente ha demostrado que la presencia de islas de patogenicidad, disminuye el fitness de las ExPEC, cuando están creciendo en orina<sup>266</sup>. Por otro lado, otros autores, han descrito la ocurrencia de un alto número de bacterias hiper mutantes entre la poblaciones bacterianas productoras de BLEE<sup>267</sup> y que el fenotipo hiper mutante le confiere un beneficio a las ExPEC, mientras están creciendo en orina pero no en caldo Luria Bertani (LB) y mientras están produciendo infección del tracto urinario<sup>268</sup>. Paralelamente, Denamur et al. propusieron que son los microorganismos con frecuencias intermedias de mutación (más que los con muy alta o baja frecuencia de mutación) los que favorecen el desarrollo y la selección de microorganismos multiresistentes.<sup>269</sup>. Finalmente, Maharjan et al han sugerido que la proporción de mutadores/no mutadores dentro de una población bacteriana presentan un comportamiento dinámico; variando hacia una u otra sub población de acuerdo a ventajas competitivas encontradas en diferentes condiciones de crecimiento<sup>270</sup>

Teniendo todo esto en mente, podría hipotetizarse que en una población que crece en orina, la coexistencia de islas de patogenicidad y resistencia a fluoroquinolonas podría generar un impacto sobre el fitness bacteriano, lo cual a su vez favorecería el predominio

de una población hiper mutante. La pérdida de islas de patogenicidad aliviarían ese stress sobre el fitness, estabilizando la población hacia formas menos mutadoras.

Esta relación inversa entre resistencia y virulencia podría explicarse aún más, a partir de los resultados aportados por el grupo de Burrus y colaboradores. Recientemente estos investigadores han demostrado un mecanismo regulatorio común entre el aparato conjugativo de los plásmidos IncA/C y la escisión y movilización de algunas islas genómicas en *Salmonella* sp. y *Vibrio* sp.<sup>271 272</sup>. De acuerdo a esto, AcaCD sería un potente activador de algunos genes *tra* de la maquinaria conjugativa de los plásmidos IncA/C, como ser *traF*, *traL* y *traI*<sup>272</sup>. Adicionalmente AcaCD tendría sitios de unión en regiones del cromosoma bacteriano, relacionado a islas de patogenicidad, habiendo encontrado estos sitios también en el genoma de *E. coli*<sup>272</sup>.

Los plásmidos IncA/C se encuentran dentro de los plásmidos denominados epidémicos, relacionados a resistencia,<sup>149</sup> la llegada de estos plásmidos a la vez que aporta genes de resistencia a antibióticos, aumentaría entonces la probabilidad de escisión de las islas de patogenicidad.

## **6\_Conclusiones y perspectivas:**



De acuerdo a nuestros resultados, CTX-M-15 es la BLEE preponderante en aislamientos clínicos de *E. coli* obtenido de distintas muestras y en diferentes hospitales, mientras CTX-M-14 sería otra BLEE emergente, que se diseminaría a través de plásmidos conjugativos, incluso entre cepas que ya presentan BLEE como se puede ver en los aislamientos portadores de CTX-M-2. Por su parte CTX-M-2, si bien permanece en un segundo lugar, se encuentra bastante distanciada de CTX-M-15 y casi compartiendo el lugar con CTX-M-14. Este cambio epidemiológico, se habría producido progresivamente en los últimos 10 años.

En cuanto a la diseminación de los aislamientos productores de BLEE encontramos un comportamiento mixto, clonal en lo concerniente a CTX-M-15, donde dos clones explican la diseminación del 90% (33/37) de los aislamientos productores de esta enzima y el 60% (33/55) del total de las BLEE. Por otro lado, la diseminación de CTX-M-2 y CTX-M-14 tiene un comportamiento alodémico. En el caso de CTX-M-14 se observa su inclusión en plásmidos de tipo IncI, conjugativos, acompañados de sistemas de toxina anti toxinas, que podrían jugar un papel importante en el mantenimiento de dichos plásmidos una vez que cesa la presión de selección ejercida por los antibióticos.

Dentro de los mecanismos de resistencia transferibles a quinolonas, la enzima acetilante de aminoglucósidos Aac(6')Ib-cr fue claramente el mecanismo de resistencia más frecuente, y se encontró asociado a CTX-M-15. Los genes *qnrB* y *qnrA* se encontraron en un solo aislamiento cada uno, asociados a CTX-M-8 y CTX-M-9 respectivamente.

De los 164 aislamientos de *E. coli* estudiados provenientes de infecciones extra intestinales, 121 pertenecieron a los GF B2 y D, pero solo 103 se definieron como ExPEC de acuerdo al TV. Cuando se categorizaron los aislamientos como ExPEC de acuerdo al TV y no por su GF, se encontraron asociaciones significativas entre la presencia de los genes *papA*, *papC*, *papEF*, *papGII-III*, *papGII*, *sfa/foc*, *fyuA*, y *K1* y la sensibilidad a fluoroquinolonas y oximinocefalosporinas.

También se observó asociación entre la presencia de *iutA* y la resistencia a estos antibióticos, pero el balance general es que los aislamientos sensibles presentan un capital menor de los GV buscados en este trabajo.

Esta relación es lo suficientemente significativa como para poder diseñar un score diagnóstico en base a genes de virulencia, que puede separar dos poblaciones que tienen probabilidades de resistencia a fluoroquinolonas y oximinocefalosporinas completamente diferentes.

Esta diferencia de GV se observa incluso en aquellos aislamientos que pertenecieron al mismo ST, como puede verse en los ST131 y ST405 donde el capital de GV es mayor en los aislamientos sensibles que en aquellos resistentes.

La mayoría de los secuenciotipos detectados, tanto en la población de microorganismos resistentes como sensibles, pertenecieron a ST pandémicos como ST73, ST95, ST69, ST131 y ST405.

En suma, consideramos que este trabajo aporta una primera visión de las características de los clones de ExPEC circulantes en nuestro país, portadores de resistencia tanto a oximinocefalosporinas como a fluoroquinolonas. Si bien nuestros resultados provienen de solo tres hospitales, es posible pensar que este comportamiento se repita a nivel nacional. Las asociaciones detectadas entre determinados genes de virulencia y la sensibilidad a fluoroquinolonas y/u oximinocefalosporinas, permitirían desarrollar métodos de estudio rápidos (por ejemplo, en base a detección de genes de virulencia mediante PCR en tiempo real), que permitan predecir la probabilidad de que estos microorganismos sean sensibles o resistentes a estos antibióticos.

Por lo comentado anteriormente, entre las perspectivas claras de este trabajo surgen:

- A. estudiar la clonalidad de los aislamientos de *E. coli* productores de BLEE y resistencia a fluoroquinolonas a nivel nacional, para verificar si presentan el mismo comportamiento epidemiológico que el encontrado en este trabajo.
- B. Ampliar el estudio de factores de virulencia en ExPEC para corroborar que el score de genes de virulencia, puede utilizarse para predecir sensibilidad a oximinocefalosporinas y fluoroquinolonas.
- C. En caso de verificarse la clonalidad de los ExPEC portadores de BLEE, considerar la producción de inmunizantes, que eventualmente pudieran utilizarse como vacunas en poblaciones susceptibles a presentar infecciones por estos microorganismos.

## 7\_Presentaciones a congresos y Publicaciones:

### Presentaciones a Congresos:

XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología - ALAM Cartagena Colombia 2014 **Vignoli R, García V, Cordeiro NF, Bado I, Seija V, Algorta G, Araújo L, Bazet C, Gutkind G, Chabalgoity A**: Diseminación de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) y Resistencia Transferible a Quinolonas (RTQ) en *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* en Uruguay.

XV Congreso Panamericano de Infectología, Punta del Este, Uruguay 2011. **Vignoli R, Cordeiro N, Robino L, García V, Bado I, Bazet C, Seija V, Chabalgoity A**. Diseminación Clonal de *E.coli* Patógeno Extraintestinal (ExPEC) productor de  $\beta$  lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en Uruguay” Presentación Oral

### Publicaciones:

**Vignoli R, García-Fulgueiras V, Cordeiro NF, Bado I, Seija V, Aguerrebere P, Laguna G, Araújo L, Bazet C, Gutkind G, Chabalgoity A**. 2016 Extended-spectrum  $\beta$ -lactamasas, transferable quinolone-resistance and Virulotyping in extra intestinal *E. coli* in Uruguay. J Infect Dev Ctries. 10:1:43-52

**Bado I, Gutierrez C, Garcia-Fulgueiras V, Cordeiro NF, Araújo Pirez L, Seija V, Bazet C, Rieppi G, Vignoli R**. 2016 CTX-M-15 in combination with *aac(6')-Ib-cr* is the most prevalent mechanism of resistance both in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, including *K. pneumoniae* ST258, in an ICU in Uruguay. J. Glob. Antimicrob. Resist. 6:5-9

## 7. Bibliografía:

1. Kilani B, Ammari L, Benaïssa HT et al. *Escherichia vulneris* as a cause of bacteremia in a patient with chronic lymphocytic leukemia. *Int J Infect Dis* 2008; **12**: 110-1.
2. Lagacé-Wiens PRS, Baudry PJ, Pang P et al. First Description of an Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing Multidrug-Resistant *Escherichia fergusonii* Strain in a Patient with Cystitis. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 2301-2.
3. Yamanaka T, Sumita-Sasazaki Y, Sugimori C et al. Biofilm-like structures and pathogenicity of *Escherichia hermannii* YS-11, a clinical isolate from a persistent apical periodontitis lesion. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; **59**: 456-65.
4. Hyma KE, Lacher DW, Nelson AM et al. Evolutionary Genetics of a New Pathogenic *Escherichia* Species: *Escherichia albertii* and Related *Shigella boydii* Strains. *J Bacteriol* 2005; **187**: 619-28.
5. Blanco M, Blanco J, Blanco JE et al. Virulence factors and O serogroups of *Escherichia coli* as a cause of community-acquired urinary infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1995; **13**: 236-41.
6. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 2000; **181**: 261-72.
7. Ron EZ. Distribution and evolution of virulence factors in septicemic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 2010; **300**: 367-70.
8. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* 1991; **4**: 80-128.
9. Lane MC, Mobley HL. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int* 2007; **72**: 19-25.
10. Busch A, Waksman G. Chaperone-usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; **367**: 1112-22.
11. Stromberg N, Nyholm PG, Pascher I et al. Saccharide orientation at the cell surface affects glycolipid receptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**: 9340-4.

12. Petri W, Mann B, Huston C. Microbial Adherence. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*: Churchill Livingstone 2010; 15-25.
13. Ulett GC, Totsika M, Schaale K et al. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Curr Opin Microbiol* 2013; **16**: 100-7.
14. Simms AN, Mobley HL. PapX, a P fimbrial operon-encoded inhibitor of motility in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2008; **76**: 4833-41.
15. Servin AL. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 2005; **18**: 264-92.
16. Le Bouguenec C. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 2005; **295**: 471-8.
17. Mainil J. *Escherichia coli* virulence factors. *Vet Immunol Immunopathol* 2013; **152**: 2-12.
18. Guignot J, Hudault S, Kansau I et al. Human Decay-Accelerating Factor and CEACAM Receptor-Mediated Internalization and Intracellular Lifestyle of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli* in Epithelial Cells. *Infection and Immunity* 2009; **77**: 517-31.
19. Anderson KL, Billington J, Pettigrew D et al. An atomic resolution model for assembly, architecture, and function of the Dr adhesins. *Mol Cell* 2004; **15**: 647-57.
20. Ott M, Hoschutzky H, Jann K et al. Gene clusters for S fimbrial adhesin (sfa) and F1C fimbriae (foc) of *Escherichia coli*: comparative aspects of structure and function. *J Bacteriol* 1988; **170**: 3983-90.
21. Dobrindt U, Blum-Oehler G, Hartsch T et al. S-Fimbria-encoding determinant sfa(I) is located on pathogenicity island III(536) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun* 2001; **69**: 4248-56.
22. Khan AS, Kniep B, Oelschlaeger TA et al. Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2000; **68**: 3541-7.
23. Lasaro MA, Salinger N, Zhang J et al. F1C fimbriae play an important role in biofilm formation and intestinal colonization by the *Escherichia coli* commensal strain Nissle 1917. *Appl Environ Microbiol* 2009; **75**: 246-51.
24. Gunther NWt, Snyder JA, Lockett V et al. Assessment of virulence of uropathogenic *Escherichia coli* type 1 fimbrial mutants in which the invertible element is phase-locked on or off. *Infect Immun* 2002; **70**: 3344-54.

25. Klemm P. Two regulatory fim genes, fimB and fimE, control the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *EMBO J* 1986; **5**: 1389-93.
26. Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD et al. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J* 2000; **19**: 2803-12.
27. Szemiako K, Krawczyk B, Samet A et al. A subset of two adherence systems, acute pro-inflammatory pap genes and invasion coding dra, fim, or sfa, increases the risk of *Escherichia coli* translocation to the bloodstream. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; **32**: 1579-82.
28. Linhartova I, Bumba L, Más in J et al. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol Rev* 2010; **34**: 1076-112.
29. Bakás L, Maté S, Vazquez R et al. Action mechanism of *Escherichia coli* alpha-hemolysin toxin. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2013; **47**: 353-61.
30. Herlax V, Henning MF, Bernasconi AM et al. The lytic mechanism of *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin associated to outer membrane vesicles: Lytic action mechanism of OMVs-associated HlyA. *Health* 2010; **2**: 484-92.
31. Sotomayor-Perez AC, Ladant D, Chenal A. Calcium-induced folding of intrinsically disordered repeat-in-toxin (RTX) motifs via changes of protein charges and oligomerization states. *J Biol Chem* 2011; **286**: 16997-7004.
32. Lemonnier M, Landraud L, Lemichez E. Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. *FEMS Microbiol Rev* 2007; **31**: 515-34.
33. Landraud L, Gibert M, Popoff MR et al. Expression of cnf1 by *Escherichia coli* J96 involves a large upstream DNA region including the hlyCABD operon, and is regulated by the RfaH protein. *Mol Microbiol* 2003; **47**: 1653-67.
34. Davis JM, Carvalho HM, Rasmussen SB et al. Cytotoxic necrotizing factor type 1 delivered by outer membrane vesicles of uropathogenic *Escherichia coli* attenuates polymorphonuclear leukocyte antimicrobial activity and chemotaxis. *Infect Immun* 2006; **74**: 4401-8.
35. McNichol BA, Rasmussen SB, Carvalho HM et al. Two domains of cytotoxic necrotizing factor type 1 bind the cellular receptor, laminin receptor precursor protein. *Infect Immun* 2007; **75**: 5095-104.
36. Landraud L, Pulcini C, Gounon P et al. *E. coli* CNF1 toxin: A two-in-one system for host-cell invasion. *Int J Med Microbiol* 2004; **293**: 513-8.

37. Contamin S, Galmiche A, Doye A et al. The p21 Rho-activating Toxin Cytotoxic Necrotizing Factor 1 Is Endocytosed by a Clathrin-independent Mechanism and Enters the Cytosol by an Acidic-dependent Membrane Translocation Step. *Mol Biol Cell* 2000; **11**: 1775-87.
38. Doye A, Mettouchi A, Bossis G et al. CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell* 2002; **111**: 553-64.
39. Wang MH, Kim KS. Cytotoxic necrotizing factor 1 contributes to *Escherichia coli* meningitis. *Toxins* 2013; **5**: 2270-80.
40. Garenaux A, Caza M, Dozois CM. The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 2011; **153**: 89-98.
41. Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007; **71**: 413-51.
42. Wyckoff EE, Duncan D, Torres AG et al. Structure of the *Shigella dysenteriae* haem transport locus and its phylogenetic distribution in enteric bacteria. *Mol Microbiol* 1998; **28**: 1139-52.
43. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* 2008; **85**: 11-9.
44. Flo TH, Smith KD, Sato S et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 2004; **432**: 917-21.
45. Caza M, Lépine F, Milot S et al. Specific Roles of the iroBCDEN Genes in Virulence of an Avian Pathogenic *Escherichia coli* O78 Strain and in Production of Salmochelins. *Infect Immun* 2008; **76**: 3539-49.
46. Feldmann F, Sorsa LJ, Hildinger K et al. The salmochelin siderophore receptor IroN contributes to invasion of urothelial cells by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in vitro. *Infect Immun* 2007; **75**: 3183-7.
47. Chaturvedi KS, Hung CS, Crowley JR et al. The siderophore yersiniabactin binds copper to protect pathogens during infection. *Nat Chem Biol* 2012; **8**: 731-6.
48. Achard ME, Chen KW, Sweet MJ et al. An antioxidant role for catecholate siderophores in *Salmonella*. *Biochem J* 2013; **454**: 543-9.
49. Adler C, Corbalan NS, Peralta DR et al. The Alternative Role of Enterobactin as an Oxidative Stress Protector Allows *Escherichia coli* Colony Development. *PLoS One* 2014; **9**: e84734.



50. Chaturvedi KS, Hung CS, Giblin DE et al. Cupric yersiniabactin is a virulence-associated superoxide dismutase mimic. *ACS Chem Biol*.
51. Whitfield C, Roberts IS. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1999; **31**: 1307-19.
52. Roberts IS. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 1996; **50**: 285-315.
53. Cross AS, Gemski P, Sadoff JC et al. The importance of the K1 capsule in invasive infections caused by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1984; **149**: 184-93.
54. Kaijser B, Jodal U. *Escherichia coli* K5 antigen in relation to various infections and in healthy individuals. *Journal of Clinical Microbiology* 1984; **19**: 264-6.
55. Willis LM, Whitfield C. Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways. *Carbohydr Res* 2013; **378**: 35-44.
56. Herzer PJ, Inouye S, Inouye M et al. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1990; **172**: 6175-81.
57. Johnson JR, Kuskowski MA, Owens K et al. Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among *Escherichia coli* isolates from animals and humans. *J Infect Dis* 2003; **188**: 759-68.
58. Karisik E, Ellington MJ, Livermore DM et al. Virulence factors in *Escherichia coli* with CTX-M-15 and other extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 54-8.
59. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000; **66**: 4555-8.
60. Cabrera AS, Sosa L, Arteta Z et al. [Rational use of antibiotics in the department of internal medicine from a university hospital: results of a pilot experience]. *Rev Chilena Infectol* 2012; **29**: 7-13.
61. Telechea H, Speranza N, Lucas L et al. [Antibiotic consumption and antimicrobial susceptibility evolution in the Centro Hospitalario Pereira Rossell in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* era]. *Rev Chilena Infectol* 2009; **26**: 413-9.
62. Suárez C, Gudíol F. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; **32**: 116-29.



63. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. . *Br J Exp Pathol* 1929; **10**: 226-36.
64. Howie J. Penicillin: 1929-40. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986; **293**: 158-9.
65. Abraham EP, Chain E, Fletcher CM et al. Further Observations on Penicillin. *Lancet* 1941; **238**: 177-89.
66. Chain E, Florey HW, Gardner AD et al. Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet* 1940; **236**: 226-8.
67. Drawz SM, Papp-Wallace KM, Bonomo RA. New  $\beta$ -lactamase inhibitors: A therapeutic renaissance in an MDR world. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **54**: 1835-46.
68. Pucci MJ, Bush K. Investigational Antimicrobial Agents of 2013. *Clin Microbiol Rev* 2013; **26**: 792-821.
69. Chambers HF. Penicillins and  $\beta$ -lactam Inhibitors. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia: Churchill, Livingstone-ELSEVIER, 2009; 309-22.
70. Andes DR, Craig WA. Cephalosporins. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2009; 323-39.
71. Chambers HF. Carbapenems and Monobactams. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia: Churchill, Livingstone-ELSEVIER, 2009; 341-5.
72. Barreteau H, Kovac A, Boniface A et al. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 2008; **32**: 168-207.
73. Bouhss A, Trunkfield AE, Bugg TD et al. The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol Rev* 2008; **32**: 208-33.
74. Mohammadi T, van Dam V, Sijbrandi R et al. Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *EMBO J* 2011; **30**: 1425-32.
75. Sauvage E, Kerff F, Terrak M et al. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 2008; **32**: 234-58.
76. Banzhaf M, van den Berg van Saparoea B, Terrak M et al. Cooperativity of peptidoglycan synthases active in bacterial cell elongation. *Mol Microbiol* 2012; **85**: 179-94.

77. Typas A, Banzhaf M, Gross CA et al. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol* 2012; **10**: 123-36.
78. González-Leiza SM, de Pedro MA, Ayala JA. AmpH, a Bifunctional dd-Endopeptidase and dd-Carboxypeptidase of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 2011; **193**: 6887-94.
79. Karlowsky JA, Adam HJ, DeCorby MR et al. In Vitro Activity of Ceftaroline against Gram-Positive and Gram-Negative Pathogens Isolated from Patients in Canadian Hospitals in 2009. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011; **55**: 2837-46.
80. Peacock SJ, Paterson GK. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem* 2015; **84**: 577-601.
81. Ubukata K, Chiba N, Hasegawa K et al. Antibiotic susceptibility in relation to penicillin-binding protein genes and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* strains responsible for meningitis in Japan, 1999 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 1488-94.
82. Ropp PA, Hu M, Olesky M et al. Mutations in ponA, the gene encoding penicillin-binding protein 1, and a novel locus, penC, are required for high-level chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 769-77.
83. Skaare D, Lia A, Hannisdal A et al. *Haemophilus influenzae* with Non-Beta-Lactamase-Mediated Beta-Lactam Resistance: Easy To Find but Hard To Categorize. *Journal of Clinical Microbiology* 2015; **53**: 3589-95.
84. Moyá B, Beceiro A, Cabot G et al. Pan- $\beta$ -Lactam Resistance Development in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains: Molecular Mechanisms, Penicillin-Binding Protein Profiles, and Binding Affinities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012; **56**: 4771-8.
85. Ba X, Harrison EM, Edwards GF et al. Novel mutations in penicillin-binding protein genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates that are methicillin resistant on susceptibility testing, but lack the mec gene. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2014; **69**: 594-7.
86. Chan LC, Gilbert A, Basuino L et al. PBP4 mediates high-level resistance to new generation cephalosporins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2016.
87. Tängdén T, Adler M, Cars O et al. Frequent emergence of porin-deficient subpopulations with reduced carbapenem susceptibility in ESBL-producing *Escherichia*

*coli* during exposure to ertapenem in an in vitro pharmacokinetic model. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 1319-26.

88. Tran Q-T, Mahendran KR, Hajjar E et al. Implication of Porins in  $\hat{\text{I}}^2$ -Lactam Resistance of *Providencia stuartii*. *Journal of Biological Chemistry*; **285**: 32273-81.

89. Rumbo C, Gato E, López M et al. Contribution of Efflux Pumps, Porins, and  $\beta$ -Lactamases to Multidrug Resistance in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 5247-57.

90. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; **289**: 321-31.

91. Matagne A, Lamotte-Brasseur J, Frere JM. Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity. *Biochem J* 1998; **330 ( Pt 2)**: 581-98.

92. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 24-38.

93. Palzkill T. Metallo-beta-lactamase structure and function. *Ann N Y Acad Sci*; **1277**: 91-104.

94. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of {beta}-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 969-76.

95. Jeon J, Lee J, Lee J et al. Structural Basis for Carbapenem-Hydrolyzing Mechanisms of Carbapenemases Conferring Antibiotic Resistance. *Int J Mol Sci* 2015; **16**: 9654.

96. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 1211-33.

97. Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; **33**: 259-63.

98. Majiduddin FK, Palzkill T. An analysis of why highly similar enzymes evolve differently. *Genetics* 2003; **163**: 457-66.

99. Rodriguez MM, Power P, Radice M et al. Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 4895-7.

100. Rodriguez MM, Power P, Sader H et al. Novel chromosome-encoded CTX-M-78  $\beta$ -lactamase from a *Kluyvera georgiana* clinical isolate as a putative origin of CTX-M-25 subgroup. *Antimicrob Agents Chemother* 2010: 3070-1.

101. Power P, Di Conza J, Rodríguez MM et al. Biochemical Characterization of PER-2 and Genetic Environment of blaPER-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007; **51**: 2359-65.
102. Canton R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006; **9**: 466-75.
103. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007; **59**: 165-74.
104. Gutkind GO, Di Conza J, Power P et al. beta-lactamase-mediated resistance: a biochemical, epidemiological and genetic overview. *Curr Pharm Des* 2013; **19**: 164-208.
105. D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L et al. CTX-M-type beta-lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol*; **303**: 305-17.
106. Cantón R, Gonzalez-Alba JM, Galan JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol* 2012; **3**: 110.
107. Eckert C, Gautier V, Arlet G. DNA sequence analysis of the genetic environment of various blaCTX-M genes. *J Antimicrob Chemother* 2006; **57**: 14-23.
108. Cattoir V, Nordmann P, Silva-Sanchez J et al. ISEcp1-Mediated Transposition of qnrB-Like Gene in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 2929-32.
109. Poirel L, Decousser JW, Nordmann P. Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a bla(CTX-M) beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 2938-45.
110. Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. Common regions e.g. orf513 and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class 1 integrons. *J Antimicrob Chemother* 2006; **58**: 1-6.
111. Carattoli A. Plasmids in Gram negatives: Molecular typing of resistance plasmids. *Int J Med Microbiol* 2011; **301**: 654-8.
112. Emmerson AM, Jones AM. The quinolones: decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; **51**: 13-20.
113. Ward-Mcquaid JF, Jichlinski D, Macis R. Nalidixic Acid in Urinary Infections. *Br Med J* 1963; **2**: 1311-4.
114. Strahilevitz J, Hooper D. Quinolones. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia, Churchill, Livingstone-ELSEVIER 2009; 487.

115. Collin F, Karkare S, Maxwell A. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; **92**: 479-97.
116. Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1997; **61**: 377-92.
117. Roca J, Wang JC. DNA transport by a type II DNA topoisomerase: evidence in favor of a two-gate mechanism. *Cell* 1994; **77**: 609-16.
118. Costenaro L, Grossmann JG, Ebel C et al. Modular structure of the full-length DNA gyrase B subunit revealed by small-angle X-ray scattering. *Structure* 2007; **15**: 329-39.
119. Aedo S, Tse-Dinh YC. Isolation and quantitation of topoisomerase complexes accumulated on *Escherichia coli* chromosomal DNA. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 5458-64.
120. Zhang H, Guo J, Li D et al. Confirmation of quinolone-induced formation of gyrase-DNA conjugates using AFM. *Bioorg Med Chem Lett* 2013; **23**: 4622-6.
121. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; **51**: 1109-17.
122. Kim ES, Hooper DC. Clinical importance and epidemiology of quinolone resistance. *Infect Chemother* 2014; **46**: 226-38.
123. Domenech-Sanchez A, Martinez-Martinez L, Hernandez-Alles S et al. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 Porin in Antimicrobial Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3332-5.
124. Li XZ, Plesiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2015; **28**: 337-418.
125. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**: 20-51.
126. Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2006; **19**: 382-402.
127. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *The Lancet* 1998; **351**: 797-9.
128. Wang M, Tran JH, Jacoby GA et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 2242-8.

129. Wang M, Sahm DF, Jacoby GA et al. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the qnr gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 1295-9.
130. Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 3050-2.
131. Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 118-25.
132. Vinué L, Corcoran MA, Hooper DC et al. Mutations That Enhance the Ciprofloxacin Resistance of *Escherichia coli* with qnrA1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2016; **60**: 1537-45.
133. Quiroga MP, Andres P, Petroni A et al. Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including aac(6)-Ib-cr, and a novel allele, qnrB10, associated with ISCR1 in clinical enterobacterial isolates from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 4466-70.
134. Wang M, Guo Q, Xu X et al. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 1892-7.
135. Cavaco LM, Hasman H, Xia S et al. qnrD, a Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky and Bovismorbificans Strains of Human Origin. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 603-8.
136. Hopkins KL, Wootton L, Day MR et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrS1 found in *Salmonella enterica* strains isolated in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; **59**: 1071-5.
137. Fonseca EL, Dos Santos Freitas F, Vieira VV et al. New qnr gene cassettes associated with superintegron repeats in *Vibrio cholerae* O1. *Emerg Infect Dis* 2008; **14**: 1129-31.
138. da Fonseca EL, Vicente AC. Functional characterization of a Cassette-specific promoter in the class 1 integron-associated *qnrVC1* gene. *Antimicrob Agents Chemother*; **56**: 3392-4.
139. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2006; **12**: 83-8.



140. Bado I, Gutiérrez C, García-Fulgueiras V et al. CTX-M-15 in combination with aac(6')-Ib-cr is the most prevalent mechanism of resistance both in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, including *K. pneumoniae* ST258, in an ICU in Uruguay. *J Glob Antimicrob Resist* 2016; **6**: 5-9.
141. Cruz GR, Radice M, Sennati S et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among oxyiminocephalosporin-resistant Enterobacteriaceae in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013; **108**: 924-7.
142. Sorensen AH, Hansen LH, Johannesen E et al. Conjugative plasmid conferring resistance to olaquinox. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 798-9.
143. Hansen LH, Jensen LB, Sorensen HI et al. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2007; **60**: 145-7.
144. Rodríguez-Martínez JM, Díaz de Alba P, Briales A et al. Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013; **68**: 68-73.
145. Yamane K, Wachino J-i, Suzuki S et al. New Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Efflux Pump, QepA, Found in an *Escherichia coli* Clinical Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007; **51**: 3354-60.
146. Perichon B, Courvalin P, Galimand M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 2464-9.
147. Jakobsen L, Cattoir V, Jensen KS et al. Impact of low-level fluoroquinolone resistance genes qnrA1, qnrB19 and qnrS1 on ciprofloxacin treatment of isogenic *Escherichia coli* strains in a murine urinary tract infection model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2012; **67**: 2438-44.
148. Guillard T, Cambau E, Chau F et al. Ciprofloxacin Treatment Failure in a Murine Model of Pyelonephritis Due to an AAC(6')-Ib-cr-Producing *Escherichia coli* Strain Susceptible to Ciprofloxacin In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013; **57**: 5830-5.
149. Carattoli A. Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 2227-38.

150. Poirel L, Ros A, Carricajo A et al. Extremely Drug-Resistant *Citrobacter freundii* Isolate Producing NDM-1 and Other Carbapenemases Identified in a Patient Returning from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 447-8.
151. Paterson DL, Doi Y. A step closer to extreme drug resistance (XDR) in gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* 2007; **45**: 1179-81.
152. Macedo-Viñas M, Cordeiro NF, Bado I et al. Surveillance of antibiotic resistance evolution and detection of class 1 and 2 integrons in human isolates of multi-resistant *Salmonella* Typhimurium obtained in Uruguay between 1976 and 2000. *Int J Infect Dis* 2009; **13**: 342-8.
153. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 268-81.
154. Million-Weaver S, Camps M. Mechanisms of plasmid segregation: have multicopy plasmids been overlooked? *Plasmid* 2014; **75**: 27-36.
155. Williams JJ, Hergenrother PJ. Exposing plasmids as the Achilles' heel of drug-resistant bacteria. *Curr Opin Chem Biol* 2008; **12**: 389-99.
156. Diaz R, Rech J, Bouet JY. Imaging centromere-based incompatibilities: Insights into the mechanism of incompatibility mediated by low-copy number plasmids. *Plasmid* 2015; **80**: 54-62.
157. Carattoli A, Bertini A, Villa L et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005; **63**: 219-28.
158. Buts L, Lah J, Dao-Thi MH et al. Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. *Trends Biochem Sci* 2005; **30**: 672-9.
159. Hayes F. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* 2003; **301**: 1496-9.
160. Rankin DJ, Turner LA, Heinemann JA et al. The coevolution of toxin and antitoxin genes drives the dynamics of bacterial addiction complexes and intragenomic conflict. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2012; **279**: 3706-15.
161. Fozo EM, Makarova KS, Shabalina SA et al. Abundance of type I toxin-antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. *Nucleic Acids Res* 2010; **38**: 3743-59.
162. Blower TR, Short FL, Rao F et al. Identification and classification of bacterial Type III toxin-antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. *Nucleic Acids Res* 2012; **40**: 6158-73.



163. Dy RL, Przybilski R, Semeijn K et al. A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a Type IV toxin-antitoxin mechanism. *Nucleic Acids Res* 2014; **42**: 4590-605.
164. Wang X, Lord DM, Cheng HY et al. A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nat Chem Biol* 2012; **8**: 855-61.
165. Leplae R, Geeraerts D, Hallez R et al. Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Res* 2011; **39**: 5513-25.
166. Mruk I, Kobayashi I. To be or not to be: regulation of restriction-modification systems and other toxin-antitoxin systems. *Nucleic Acids Res* 2014; **42**: 70-86.
167. Smillie C, Garcillan-Barcia MP, Francia MV et al. Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010; **74**: 434-52.
168. Halary S, Leigh JW, Cheaib B et al. Network analyses structure genetic diversity in independent genetic worlds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 127-32.
169. Guglielmini J, de la Cruz F, Rocha EP. Evolution of conjugation and type IV secretion systems. *Mol Biol Evol* 2013; **30**: 315-31.
170. Norman A, Hansen LH, Sorensen SJ. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009; **364**: 2275-89.
171. Alvarez-Martinez CE, Christie PJ. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009; **73**: 775-808.
172. Garcillan-Barcia MP, Francia MV, de la Cruz F. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev* 2009; **33**: 657-87.
173. Arutyunov D, Frost LS. F conjugation: back to the beginning. *Plasmid* 2014; **70**: 18-32.
174. Harris RL, Hombs V, Silverman PM. Evidence that F-plasmid proteins TraV, TraK and TraB assemble into an envelope-spanning structure in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2001; **42**: 757-66.
175. Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microbiol Rev* 2013; **26**: 185-230.
176. Morosini MI, Ayala JA, Baquero F et al. Biological cost of AmpC production for *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 3137-43.

177. Fernandez A, Perez A, Ayala JA et al. Expression of OXA-type and SFO-1 beta-lactamases induces changes in peptidoglycan composition and affects bacterial fitness. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 1877-84.
178. Cordeiro NF, Chabalgoity JA, Yim L et al. Synthesis of Metallo-beta-Lactamase VIM-2 Is Associated with a Fitness Reduction in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 6528-35.
179. Pedreira W, Bazet C, López L. Nuevos mecanismos de resistencia bacteriana, Nuevas  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de amplio espectro. Su importancia clínica y epidemiología actual. *ArchMedInt* 1990; **12**: 43-5.
180. Torres ME, Pirez MC, Schelotto F et al. Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogens and unusual isolates. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 2134-9.
181. Vignoli R, Varela G, Mota MI et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying genes encoding the PER-2 and TEM-116 extended-spectrum beta-lactamases isolated from children with diarrhea in Uruguay. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 2940-3.
182. Vignoli R, Cordeiro N, Seija V et al. Genetic environment of CTX-M-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitalized patients in Uruguay. *Rev Argent Microbiol* 2006; **38**: 84-8.
183. Cordeiro NF, Robino L, Medina J et al. Ciprofloxacin-resistant enterobacteria harboring the *aac(6')-Ib-cr* variant isolated from feces of inpatients in an intensive care unit in Uruguay. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 806-7.
184. Bado I, Cordeiro NF, Robino L et al. Detection of Class 1 and 2 Integrons, Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases and *qnr* alleles in Enterobacterial Isolates From the Digestive Tract of Intensive Care Unit Inpatients. *Int J Antimicrob Agents* 2010; **36**: 453-8.
185. Garcia-Fulgueiras V, Bado I, Mota MI et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates in the paediatric hospital of Uruguay. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 1725-9.
186. Smith SP, Manges AR, Riley LW. Temporal changes in the prevalence of community-acquired antimicrobial-resistant urinary tract infection affected by *Escherichia coli* clonal group composition. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 689-95.
187. Correia C, Costa E, Peres A et al. [Etiology of urinary tract infections and antimicrobial susceptibility of urinary pathogens]. *Acta Med Port* 2007; **20**: 543-50.

188. Vila J, Simon K, Ruiz J et al. Are quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* less virulent? *J Infect Dis* 2002; **186**: 1039-42.
189. Horcajada JP, Soto S, Gajewski A et al. Quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* strains from phylogenetic group B2 have fewer virulence factors than their susceptible counterparts. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 2962-4.
190. Soto SM, Jimenez de Anta MT, Vila J. Quinolones induce partial or total loss of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-dependent or -independent pathways, respectively. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 649-53.
191. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 6221; author reply -2.
192. Johnson JR, Johnston B, Kuskowski MA et al. Spontaneous conversion to quinolone and fluoroquinolone resistance among wild-type *Escherichia coli* isolates in relation to phylogenetic background and virulence genotype. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 4739-44.
193. Peirano G, Pitout JD. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents* 2010; **35**: 316-21.
194. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews* 2011; **35**: 736-55.
195. Boczek LA, Rice EW, Johnston B et al. Occurrence of antibiotic-resistant uropathogenic *Escherichia coli* clonal group A in wastewater effluents. *Appl Environ Microbiol* 2007; **73**: 4180-4.
196. Johnson JR, Menard ME, Lauderdale TL et al. Global distribution and epidemiologic associations of *Escherichia coli* clonal group A, 1998-2007. *Emerg Infect Dis* 2011; **17**: 2001-9.
197. Villegas MV, Blanco MG, Sifuentes-Osornio J et al. Increasing prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase among Gram-negative bacilli in Latin America--2008 update from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Braz J Infect Dis* 2011; **15**: 34-9.
198. Ruiz SJ, Montealegre MC, Ruiz-Garbajosa P et al. First Characterization of CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 Clones Causing Community-Onset Infections in South America. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 1993-6.

199. Sennati S, Santella G, Di Conza J et al. Changing epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 6003-5.
200. Vignoli R, Cordeiro NF, Garcia V et al. New TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase and its genomic context in plasmids from *Salmonella enterica* serovar derby isolates from Uruguay. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 781-4.
201. Pincus DH. Microbial Identification Using the bioMérieux Vitek® System – An Update. In: Miller MJ, ed. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*. River Grove, IL, USA: Bethesda, MD, USA, 2013; 85-121.
202. Treviño M, Martínez-Lamás L, Romero-Jung P et al. [Comparative assessment of the Vitek 2 and Phoenix systems for detection of extended-spectrum beta-lactamases]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; **27**: 566-70.
203. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement  
Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
204. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF et al. qnr prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 2872-4.
205. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA et al. Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 3953-5.
206. Shin SY, Kwon KC, Park JW et al. Characteristics of aac(6')-Ib-cr gene in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Chungnam area. *Korean J Lab Med* 2009; **29**: 541-50.
207. Lewis JS, 2nd, Herrera M, Wickes B et al. First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 4015-21.
208. Kim J, Lim YM. Prevalence of derepressed ampC mutants and extended-spectrum beta-lactamase producers among clinical isolates of *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., and *Serratia marcescens* in Korea: dissemination of CTX-M-3, TEM-52, and SHV-12. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 2452-5.
209. Jeong SH, Bae IK, Kwon SB et al. Dissemination of transferable CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Korea. *J Appl Microbiol* 2005; **98**: 921-7.

210. Marcano D, De Jesus A, Hernandez L et al. Frequency of enzymes associated with reduced sensitivity to beta-lactam antibiotics in enterobacteria isolates, Caracas, Venezuela. *Rev Panam Salud Publica* 2011; **30**: 529-34.
211. Kim HB, Park CH, Kim CJ et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 639-45.
212. Mnif B, Vimont S, Boyd A et al. Molecular characterization of addiction systems of plasmids encoding extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 1599-603.
213. Branger C, Zamfir O, Geoffroy S et al. Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum beta-lactamase type. *Emerg Infect Dis* 2005; **11**: 54-61.
214. Janatova M, Albrechtova K, Petrzekova KJ et al. Antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae from humans and wildlife in Dzanga-Sangha Protected Area, Central African Republic. *Vet Microbiol* 2014; **171**: 422-31.
215. Johnson JR, Owens K, Manges AR et al. Rapid and Specific Detection of *Escherichia coli* Clonal Group A by Gene-Specific PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; **42**: 2618-22.
216. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf), 2014.
217. Ironmonger D, Edeghere O, Bains A et al. Surveillance of antibiotic susceptibility of urinary tract pathogens for a population of 5.6 million over 4 years. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 1744-50.
218. Badura A, Feierl G, Pregartner G et al. Antibiotic resistance patterns of more than 120 000 clinical *Escherichia coli* isolates in Southeast Austria, 1998-2013. *Clin Microbiol Infect* 2015.
219. Seija V, Frantchez V, Pintos M et al. Etiología de la Infección Urinaria de adquisición comunitaria y perfil de Susceptibilidad de *Escherichia coli* a los principales agentes antimicrobianos. *Rev Médica Uruguay* 2010; **26**: 14-24.
220. Pedreira W, Anzalone L, Álvez M et al. Fosfomicina trometamol. Una opción terapéutica válida en infecciones urinarias bajas. *Rev Med Uruguay* 2003; **19**: 107-16.
221. Robino L, García-Fulgueiras V, Araújo L et al. Urinary tract infection in Uruguayan children: aetiology, antimicrobial resistance and uropathogenic *Escherichia coli* virulotyping. *J Glob Antimicrob Resist* 2014; **2**: 293-8.

222. Seija V, Frantchez V, Ventura V et al. Factores de riesgo asociados al desarrollo de infección urinaria de origen comunitario causada por *Escherichia coli* resistente a fluoroquinolonas. *Rev Chilena Infectol* 2014; **31**: 400-5.
223. Robino L, Telechea H, Speranza N et al. Risk Factors for the Acquisition of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Hospitalized Children. *Journal of Infection in Developing Countries* 2013; **7**: 361-4.
224. Vien le TM, Minh NN, Thuong TC et al. The co-selection of fluoroquinolone resistance genes in the gut flora of Vietnamese children. *PLoS One* 2012; **7**: e42919.
225. Medina-Presentado JC, Seija V, Vignoli R et al. Polyclonal endemicity of *Acinetobacter baumannii* in ventilated patients in an intensive care unit in Uruguay. *Int J Infect Dis* 2013; **17**: e422-7.
226. Nguyen HM, Shier KL, Graber CJ. Determining a clinical framework for use of cefepime and  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitors in the treatment of infections caused by extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 871-80.
227. Hombach M, Mouttet B, Bloemberg GV. Consequences of revised CLSI and EUCAST guidelines for antibiotic susceptibility patterns of ESBL- and AmpC  $\beta$ -lactamase-producing clinical Enterobacteriaceae isolates. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 2092-8.
228. Livermore DM, Andrews JM, Hawkey PM et al. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenems directly? *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 1569-77.
229. Paterson DL, Ko W-C, Von Gottberg A et al. Outcome of Cephalosporin Treatment for Serious Infections Due to Apparently Susceptible Organisms Producing Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamases: Implications for the Clinical Microbiology Laboratory. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 2206-12.
230. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis* 2012; **55**: 943-50.
231. Viale P, Giannella M, Lewis R et al. Predictors of mortality in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013; **11**: 1053-63.



232. Blanco J, Mora A, Mamani R 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**: 2011-21.
233. Cho SY, Kang CI, Cha MK et al. Clinical Features and Treatment Outcomes of Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Sequence Type 131. *Microb Drug Resist* 2015.
234. Ghiglione. B. Estudio de las bases bioquímicas y moleculares de la actividad hidrolítica de variantes salvajes y mutacionales de  $\beta$  actamás as CTX-M sobre oximino-cefalosporinas. Papel de mutaciones puntuales en la expansión del espectro de hidrólisis. *Departamento de Microbiología, Inmunología y Biotecnología Catedra de Microbiología*. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires, 2015; 221.
235. Bartoloni A, Pallecchi L, Riccobono E et al. Relentless increase of resistance to fluoroquinolones and expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli*: 20 years of surveillance in resource-limited settings from Latin America. *Clin Microbiol Infect* 2012; **19**: 356-61.
236. Wirtz VJ, Dreser A, Gonzales R. Trends in antibiotic utilization in eight Latin American countries, 1997-2007. *Rev Panam Salud Publica* 2010; **27**: 219-25.
237. Baquero F, Coque TM, Canton R. Allodemics. *Lancet Infect Dis* 2002; **2**: 591-2.
238. García-Fulgueiras V, Bado I, Cordeiro N et al. First report of the ceftazidimás e CTX-M-19 in South America. *New Microbes and New Infections* 2013; **1**: 44-7.
239. Bado I, Garcia-Fulgueiras V, Cordeiro NF et al. First human isolate of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis harboring blaCTX-M-14 in South America. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 2132-4.
240. Cordeiro NF, Yim L, Betancor L et al. Identification of the first blaCMY-2 gene in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates obtained from cases of paediatric diarrhoea illness detected in South America. *J Glob Antimicrob Resist* 2013; **1**: 143-8.
241. **Cordeiro NF, Nabón A, García-Fulgueiras V** et al. Analysis of plasmid mediated quinolone and oxyimino-cephalosporin resistance mechanisms in Uruguayan *Salmonella enterica* isolates from 2011 to 2013. *J Glob Antimicrob Resist* 2016; **6**: 165-71.
242. Mnif B, Harhour H, Jdidi J et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Tunisia and characterization of their virulence factors and plasmid addiction systems. *BMC Microbiology* 2013; **13**: 147.

243. Doumith M, Dhanji H, Ellington MJ et al. Characterization of plasmids encoding extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and their addiction systems circulating among *Escherichia coli* clinical isolates in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 878-85.
244. Kim SR, Funayama N, Komano T. Nucleotide sequence and characterization of the traABCD region of IncII plasmid R64. *Journal of Bacteriology* 1993; **175**: 5035-42.
245. Sakai D, Komano T. Genes Required for Plasmid R64 Thin-Pilus Biogenesis: Identification and Localization of Products of the pilK, pilM, pilO, pilP, pilR, and pilT Genes. *Journal of Bacteriology* 2002; **184**: 444-51.
246. Nielsen AK, Gerdes K. Mechanism of post-segregational killing by hok-homologue pnd of plasmid R483: Two translational control elements in the pnd mRNA. *Journal of Molecular Biology* 1995; **249**: 270-82.
247. Ludwiczak M, Dolowy P, Markowska A et al. Global transcriptional regulator KorC coordinates expression of three backbone modules of the broad-host-range RA3 plasmid from IncU incompatibility group. *Plasmid* 2013; **70**: 131-45.
248. Schumacher MA. Structural biology of plasmid segregation proteins. *Curr Opin Struct Biol* 2007; **17**: 103-9.
249. Guynet C, Cuevas A, Moncalian G et al. The stb operon balances the requirements for vegetative stability and conjugative transfer of plasmid R388. *PLoS Genet* 2011; **7**: e1002073.
250. Bagdasarian M, Bailone A, Bagdasarian MM et al. An inhibitor of SOS induction, specified by a plasmid locus in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; **83**: 5723-6.
251. Runyen-Janecky LJ, Hong M, Payne SM. The virulence plasmid-encoded *impCAB* operon enhances survival and induced mutagenesis in *Shigella flexneri* after exposure to UV radiation. *Infect Immun* 1999; **67**: 1415-23.
252. Brisson-Noël A, Arthur M, Courvalin P. Evidence for natural gene transfer from gram-positive cocci to *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 1988; **170**: 1739-45.
253. Khan WA, Seas C, Dhar U et al. Treatment of shigellosis: V. Comparison of azithromycin and ciprofloxacin: A double-blind, randomized, controlled trial. *Annals of Internal Medicine* 1997; **126**: 697-703.
254. Hoge CW, Gambel JM, Srijan A et al. Trends in Antibiotic Resistance Among Diarrheal Pathogens Isolated in Thailand Over 15 Years. *Clinical Infectious Diseases* 1998; **26**: 341-5.



255. González-Torralba A, García-Esteban C, Alós J-I. Enteropatógenos y antibióticos. *Enferm Infecc Microbiol Clín* 2016; doi: **10.1016/j.eimc.2015.06.015**
256. Harmer CJ, Hall RM. IS26-Mediated Precise Excision of the IS26-aphA1a Translocatable Unit. *mBio* 2015; **6**: e01866-15. doi: 10.1128/mBio.-15.
257. Harmer CJ, Moran RA, Hall RM. Movement of IS26-Associated Antibiotic Resistance Genes Occurs via a Translocatable Unit That Includes a Single IS26 and Preferentially Inserts Adjacent to Another IS26. *mBio* 2014; **5**: e01801-14. doi: 10.1128/mBio.-14.
258. Baquero F. From pieces to patterns: Evolutionary engineering in bacterial pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 2004; **2**: 510-8.
259. Lartigue MF, Poirel L, Nordmann P. Diversity of genetic environment of bla(CTX-M) genes. *FEMS Microbiol Lett* 2004; **234**: 201-7.
260. Poirel L, Lartigue MF, Decousser JW et al. ISEcp1B-mediated transposition of blaCTX-M in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 447-50.
261. Doumith M, Day M, Ciesielczuk H et al. Rapid Identification of Major *Escherichia coli* Sequence Types Causing Urinary Tract and Bloodstream Infections. *Journal of Clinical Microbiology* 2015; **53**: 160-6.
262. Riley LW. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20**: 380-90.
263. Radice M, Power P, Di Conza J et al. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 602-4.
264. Johnson J, Porter S, Zhanel G et al. Virulence of *Escherichia coli* clinical isolates in a murine sepsis model in relation to sequence type ST131 status, fluoroquinolone resistance, and virulence genotype. *Infect Immun* 2012; **80**: 1554 - 62.
265. Poey ME, Lavina M. Integrons in uropathogenic *Escherichia coli* and their relationship with phylogeny and virulence. *Microb Pathog*; **77**: 73-7.
266. Diard M, Garry L, Selva M et al. Pathogenicity-associated islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* are fitness elements involved in intestinal colonization. *J Bacteriol* 2010; **192**: 4885-93.
267. Baquero MR, Galan JC, del Carmen Turrientes M et al. Increased mutation frequencies in *Escherichia coli* isolates harboring extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 4754-6.

268. Labat F, Pradillon O, Garry L et al. Mutator phenotype confers advantage in *Escherichia coli* chronic urinary tract infection pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; **44**: 317-21.
269. Denamur E, Tenaillon O, Deschamps C et al. Intermediate mutation frequencies favor evolution of multidrug resistance in *Escherichia coli*. *Genetics* 2005; **171**: 825-7.
270. Maharjan RP, Liu B, Li Y et al. Mutation accumulation and fitness in mutator subpopulations of *Escherichia coli*. *Biology Letters* 2013; **9**.
271. Carraro N, Matteau D, Burrus V et al. Unraveling the regulatory network of IncA/C plasmid mobilization: When genomic islands hijack conjugative elements. *Mobile Genetic Elements* 2015; **5**: 34-8.
272. Carraro N, Matteau D, Luo P et al. The *más ter* activator of IncA/C conjugative plasmids stimulates genomic islands and multidrug resistance dissemination. *PLoS Genet* 2014; **10**: e1004714.
-