

Curso 2012/13  
**CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/35**  
I.S.B.N.: 978-84-15939-05-4

**ROSSANA ABREU RODRÍGUEZ**

**Prevalencia de Enterobacterias productoras  
de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE),  
en exudados rectales de pollos de engorde  
en granjas avícolas en la isla de Tenerife, España**

**Directoras**

**ÁNGELES ARIAS RODRÍGUEZ  
MARÍA BEATRIZ CASTRO HERNÁNDEZ  
ELENA ESPIGARES RODRÍGUEZ**



**SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS**  
**Serie Tesis Doctorales**

## Agradecimientos

*Quisiera poder dar las gracias a todas aquellas personas que han compartido conmigo de un modo u otro, estos años donde ha habido momentos buenos y momentos difíciles.*

*Me gustaría dar las gracias a la Universidad de La Laguna por concederme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral.*

*A mis directoras, Angeles Arias, María Beatriz Castro y Elena Espigares gracias por vuestra ayuda. A la Dra. Angeles Arias, le debo mi agradecimiento más profundo, por haber confiado en mí y por la oportunidad de poder llevar a cabo esta Tesis. Su opinión crítica y consejos han sido fundamentales para poder alcanzar esta meta. Quiero agradecerle de corazón todo lo que me ha enseñado, su dedicación y empeño. Gracias por los ánimos en los momentos difíciles. Gracias por estar a mi lado, en todo y para todo. Soy afortunada por haberle conocido, gracias.*

*Gracias a la Dra. María Beatriz Castro por ser mi guía y por su valiosa colaboración.*

*Gracias a Cristobalina Rodríguez, Pilar Arévalo, y Roberto Álvarez por haber estado a mi lado siempre, por la comprensión y ayuda, por alegrarse de mis logros y sobre todo por vuestra amistad.*

*Me gustaría transmitir mi agradecimiento a todas las personas que integran el Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Granada, por su apoyo y su muy valorada colaboración, sin ella hubiera sido difícil la realización de este trabajo.*

*Mi agradecimiento al Departamento de Microbiología y Parasitología y Medicina Preventiva del Hospital Universitario de Canarias (HUC), en especial a María Eugenia por vuestra valiosa colaboración.*

*A los veterinarios José Manuel Sánchez, y a Juan Carlos González la mejor de las ayudas con los pollos, con ellos, he aprendido todo lo que sé de la producción avícola, gracias.*

*Igualmente mi agradecimiento a la Licenciada Debora Riverol por su gran ayuda y apoyo.*

*Gracias de corazón a todos los que involuntariamente he olvidado citar y que en mayor o menor medida me han acompañado durante la realización de esta Tesis Doctoral.*

*Gracias.*

## **Dedicatoria**

*Este trabajo se lo quiero dedicar a mi familia, a mi madre que ha sido un ejemplo de apoyo, fortaleza, firmeza y amor.*

*A mi esposo Germán, a mis hijos, Germán Francisco, Luis Daniel y Rossana, por su amor profundo, ellos son una prueba de lo importante que es una familia.*

*A mis adoradas hermanas Nane, Lili, y Marianela. En especial a mi hermana Nane y a mi bpadre que aunque ya no estén aquí, sé lo orgullosos que estarían por este logro.*

*A mis sobrinos, Mariana, Juan Fran, Leonela, Leonardo, Lorena, Victor Manuel, José Ángel, en especial a Mariangel, a mis cuñados Alfredo y Edgar, por el cariño y por estar siempre tan cerca.*

*Gracias a todos por el amor, el apoyo, la comprensión, la confianza, por transmitirme ganas y entusiasmo para la realización de este trabajo.*



***Índice***

<i>Contenido</i>	<i>Página</i>
<b>I. INTRODUCCION y OBJETIVOS</b>	<b>1</b>
1. Introducción	1
2. Objetivos	6
<b>II. REVISIÓN Y ANTECEDENTES</b>	<b>7</b>
1. Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	7
1.1 Generalidades	7
1.2 Características antigénicas estructurales y de superficie	8
1.3 Características microbiológicas de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	12
1.4 Géneros y especies de <i>Enterobacterias</i> con importancia clínica	13
1.5 Procesos infecciosos	13
1.6 Epidemiología	14
1.7 Virulencia y Factores de Virulencia	15
1.8 Patógenos específicos	16
2. Especie <i>Escherichia coli</i>	24
2.1 Generalidades	24
2.2 Epidemiología	25
2.3 Clasificación	26
2.3.1. Patotipos patógenos	27
2.4 Animales como reservorios de <i>E. coli</i>	31
2.5 Cepas <i>E. coli</i> patogénica aviar	32
2.6 <i>E. coli</i> como agente zoonótico: importancia de los animales como reservorio de cepas patógenas	32
3. Antimicrobiano	35
3.1 Generalidades	35
3.2 Clasificación de los diferentes Antibióticos	37
4. Antibióticos $\beta$ -lactámicos	38
4.1 Generalidades	38
4.2. Mecanismo de acción	38
4.3. Clasificación y estructura química. Espectro de acción.	39
5. Mecanismos de Resistencia bacteriana	46
5.1 Genética molecular de la resistencia antimicrobiana	46
5.2. Elementos de transferencia horizontal en <i>Enterobacteriaceae</i>	47
5.2.1. Plásmidos	48
5.2.2. Elementos Genéticos Transponibles	49
5.2.3. Elementos de Integración del ADN	51
5.3. Propagación de la Resistencia	53
5.3.1. Intercambio genético entre bacterias	54
5.4. Mecanismos de resistencia antimicrobiana	56

5.4.1.	Destrucción del antibiótico mediante $\beta$ -lactamasas	56
5.4.1.1.	Generalidades	56
5.4.1.2.	Mecanismo de acción de las $\beta$ -lactamasas	57
5.4.1.3.	Clasificación de las $\beta$ -lactamasas	58
5.4.1.3.1.	Antecedentes históricos	59
5.4.1.3.2.	Clasificación molecular de Ambler (Ambler 1980)	60
5.4.1.3.3.	Clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros (Bush, Jacoby et al., 1995)	62
5.4.1.3.4.	Producción de $\beta$ -lactamasas	65
5.4.1.4.	$\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE)	66
5.4.1.4.1.	Generalidades	66
5.4.1.4.2.	Epidemiología de las <i>Enterobacterias</i> BLEE	68
5.4.1.4.3.	Reservorios de <i>E. coli</i> productor de $\beta$ -lactamasa espectro extendido (BLEE)	70
5.4.1.4.4.	Genotipos de $\beta$ -lactamasa espectro extendido (BLEE)	71
5.4.2.	Fracaso del antibiótico para atravesar la membrana externa de los microorganismos gramnegativos para alcanzar las PBP.	80
5.4.3.	Bombeo del fármaco a través de la membrana externa de las bacterias gramnegativas.	80
5.4.4.	Unión de baja afinidad del antibiótico a las PBP objetivo.	81
6.	BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos	82
6.1.	Uso de antibióticos $\beta$ -lactámicos en animales	83
6.2.	<i>E. coli</i> productor de $\beta$ -lactamasas de origen animal y alimentario	84
6.3.	Animales destinados al consumo humano	86
6.4.	<i>Enterobacterias</i> productoras $\beta$ -lactamasas de tipo CTX-M en humanos y animales.	90
6.5.	Vías de transmisión de <i>Enterobacterias</i> productoras de $\beta$ -lactamasas.	92
7.	Métodos para la detección de <i>Enterobacterias</i> productoras de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido	95
7.1.	Medios de cultivos	95
7.2.	Métodos fenotípicos	96
7.3.	Métodos moleculares	98
7.3.1.	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) a tiempo real	98
8.	Métodos de tipificación <i>Enterobacterias</i> productoras de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido	100
8.1.	Tipificación molecular de microorganismos. Electroforesis en gel de Campos Pulsantes (PFGE)	100
<b>III.</b>	<b>MATERIAL Y METODOS</b>	<b>104</b>
1.	Introducción	104
2.	Toma y transporte de las muestras	105
2.1.	Toma de la muestra	105
2.2.	Transporte y conservación de la muestra	106
3.	Aislamiento e identificación de <i>Enterobacterias</i> BLEE	106

4.	Detección fenotípica de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE)	110
4.1.	Prueba de difusión en disco	110
5.	Estudio de la resistencia antimicrobiana	112
6.	Estudio Moleculares.	114
6.1.	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real	114
7.	Tipificación molecular. Electroforesis de campos pulsantes (PFGE)	118
8.	Materiales	126
9.	Soluciones necesarias para el ensayo	128
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>132</b>
1.	Prevalencia de <i>Enterobacterias</i> productoras de $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE) en muestras de pollos sanos	132
2.	Estudio del genotipado de cepas de <i>E. coli</i> BLEE procedentes de pollos sanos	134
3.	Caracterización de <i>Enterobacterias</i> productora de $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE) en muestras de pollos sanos	137
3.1.	Estudio Moleculares	137
3.1.1.	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real	137
4.	Resistencia antibiótica de cepas de <i>Enterobacterias</i> BLEE procedentes de pollos sanos	139
4.1.	Resistencia antibiótica	139
4.1.1.	Resistencia antibiótica de cepas de <i>Escherichia coli</i> BLEE aislados BLEE	139
4.1.2.	Resistencia antibiótica de cepas de <i>K. pneumoniae</i> BLEE aislados	140
4.2.	Patrones de Resistencia en el total de muestras de cepas aisladas de <i>Enterobacteriaceae</i> BLEE	141
4.2.1.	Patrones de Resistencia en el total de muestras de cepas aisladas de <i>E. coli</i> BLEE	141
4.2.2.	Patrones de Resistencia en el total de muestras de cepas aisladas de <i>K. pneumoniae</i> BLEE	142
4.3.	Patrones Resistencia en las cepas de <i>E. coli</i> BLEE distribuidos por granjas	142
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>147</b>
1.	Prevalencia de <i>Enterobacterias</i> productoras de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en muestras de pollos sanos	148
2.	Tipos de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en muestras de pollos sanos	160
3.	Resistencia de <i>Enterobacterias</i> productoras de $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE) aislados en muestras de pollos	166
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>172</b>
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>174</b>



## ***I. Introducción y objetivos***

## I.1. *Introducción*

---

La familia *Enterobacteriaceae* son bacilos gramnegativos de gran importancia en la patología infecciosa, estando implicados en diferentes síndromes clínicos. Es el grupo de microorganismos que más frecuentemente, produce infecciones tanto en pacientes con inmunidad conservada como en inmunosuprimidos ya sea de adquisición en la comunidad como infecciones nosocomiales (Hernández *et al.*, 2003), también denominadas Infecciones relacionadas con la Asistencia Sanitaria (IRAS).

La resistencia a antibióticos constituye actualmente un problema de gran impacto en salud pública y es uno de los ejemplos que ilustran las llamadas enfermedades infecciosas emergentes. La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno biológico natural, pero el abuso y el mal empleo de los antibióticos en el tratamiento de las enfermedades humanas, así como su uso indiscriminado en veterinaria y en agricultura, ha originado un incremento continuado de fracasos en la terapia antimicrobiana debido al aumento en número y diversidad de microorganismos resistentes (Livermore 2003). Esta resistencia a agentes antimicrobianos se produce por mutación o por la adquisición de genes localizados en diferentes elementos de transmisión horizontal (ETH) como plásmidos, transposones o integrones, capaces de transmitirse entre microorganismos de la misma o de distinta especie.

El estudio de la resistencia a antibióticos ha estado centrado durante décadas en la detección de patógenos nosocomiales, como Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VRE) y *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA). Otros microorganismos

oportunistas multirresistentes causantes de infecciones importantes en los hospitales son *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, y *Burkholderia cepacia*.

En los últimos años, las infecciones adquiridas en la comunidad han centrado el interés del personal médico y científico internacional debido a la rápida diseminación de cepas resistentes y de genes de resistencia entre humanos, y también entre animales y en productos alimentarios (Jakobsen *et al.*, 2012).

Las medidas para controlar la diseminación de la resistencia a antibióticos propuestas en 1995 por la ASM en el clásico informe “Report of the ASM task force on antibiotic resistance” han resultado insuficientes ya que estaban dirigidas al control de subpoblaciones resistentes en el medio hospitalario, no teniendo en cuenta la diseminación de elementos de resistencia transmisibles o la co-selección de diferentes genes de resistencia localizados en los mismos elementos o plataformas genéticas.

Distintas organizaciones como la Organización Mundial de la Salud (WHO, [www.who.org](http://www.who.org)) o la Sociedad Americana de Microbiología (ASM, [www.asm.org](http://www.asm.org)), entre otras, han seleccionado el análisis de las variaciones temporales y espaciales de las especies bacterianas responsables de enfermedades infecciosas en humanos como uno de los temas de estudio prioritarios en salud pública. En este sentido, en el año 2003 se creó un nuevo sistema de vigilancia, el *Reservoirs of Antibiotic Resistance (ROAR)* con el objetivo de conocer el papel de la flora comensal en la aparición y diseminación de resistencia a diferentes antibióticos ([www.roarproject.org](http://www.roarproject.org)).

Los nuevos retos de la resistencia a antibióticos pueden resumirse en: i) el aumento mundial en la prevalencia de microorganismos multirresistentes tanto en los hospitales como en la comunidad, con diferencias geográficas importantes, ii) la selección y amplificación de clones epidémicos y de elementos móviles de resistencia en humanos, animales o en el medioambiente, y iii) la aparición y

diseminación de nuevos genes de resistencia de origen medioambiental y de sus unidades genéticas dispersoras (Wright 2007).

En bacterias gramnegativas una de las características predominantes de la resistencia es la producción de  $\beta$ -lactamasas. Las  $\beta$ -lactamasas, son enzimas codificadas en los cromosomas o plásmidos y actúan hidrolizando el anillo  $\beta$ -lactámico de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos inactivándolos.

Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas mediadas generalmente por plásmidos y derivan de otras enzimas con menor espectro hidrolítico (Paterson *et al.*, 2005). Las cepas productoras de enzimas  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en su mayoría Enterobacterias (Junying *et al.*, 2012), y en particular *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* son capaces de hidrolizar las cefalosporinas de amplio espectro y los monobactámicos, pero no las cefamicinas ni los carbapenémicos y las combinaciones de  $\beta$ -lactámicos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam (Tafúr *et al.*, 2008), lo que supone un problema de salud que incrementa la morbilidad y mortalidad de los pacientes hospitalizados; igualmente obliga a manejar agentes terapéuticos más tóxicos, costosos y de amplio espectro antibacteriano. Las BLEE se encuentran codificadas en plásmidos conjugativos, lo cual permite la diseminación de este mecanismo de resistencia no sólo entre distintas cepas de la misma especie sino también entre distintas especies bacterianas. Además de su codificación plasmídica, las BLEE forman parte frecuentemente de transposones o integrones lo cual determina su asociación con otros determinantes genéticos de resistencia transferibles, como los que confieren resistencia a los aminoglucósidos o al cotrimoxazol.

La aparición de las BLEE ha dificultado enormemente el tratamiento de numerosas infecciones bacterianas porque estas cepas presentan, además de resistencia a la gran mayoría de los  $\beta$ -lactámicos, altas tasas de resistencia a antimicrobianos de otras familias (Paterson *et al.*, 2005). Las primeras BLEE se describieron en 1983 en

Alemania en diferentes aislados de enterobacterias que presentaban resistencia a cefotaxima y ceftazidima y que podían transferirse por conjugación (Knothe *et al.*, 1983). Desde entonces, estos microorganismos se han descrito cada vez con más frecuencia en diferentes países del mundo. Los primeros aislados con BLEE reconocidos en España se detectaron en 1988 en 2 hospitales de Madrid y correspondían a cepas de *Escherichia coli* y de *Klebsiella pneumoniae* (Baquero *et al.*, 1988; Fernández-Rodríguez *et al.*, 1992) y la primera epidemia documentada ocurrió entre 1988 y 1990. Las cepas productoras de BLEE han ido aumentando en frecuencia progresivamente. En España desde el año 2000 el porcentaje de aislados de *E. coli* y de *K. pneumoniae* productoras de BLEE se ha multiplicado por 8 y por 2, respectivamente. El aumento de *E. coli* productor de BLEE en España se debe principalmente a cepas aisladas de pacientes no hospitalizados, en su mayoría de origen urinario. (Díaz *et al.*, 2009).

En la actualidad existe una gran preocupación por el incremento observado de estas cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), fundamentalmente en aislados procedentes de la comunidad (Paterson *et al.*, 2005; Pitout *et al.*, 2005) lo que apunta a la existencia de una subpoblación latente de cepas productor de BLEE en la población sana y por la importancia que están adquiriendo ciertos tipos de  $\beta$ -lactamasas, especialmente las del grupo CTX-M (Bonnet *et al.*, 2004; Livermore *et al.*, 2007) como un problema de salud pública por su alta capacidad de la diseminación.

Desde tiempos inmemoriales, los animales han sido una fuente importante de la enfermedad infecciosa humana (Lederberg 2000). Uno de los hábitats más indocumentados y a la vez más susceptibles de ser reservorio de este tipo de enzimas  $\beta$ -lactamasas, son los animales de granjas, los cuales a su vez podrían difundir esta resistencia a la población a través de la cadena alimentaria. En países europeos, estudios sobre la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE en particular en animales destinados al consumo humano (Li *et al.*, 2007), sugieren que sean reconocidos como importantes reservorios de *E. coli* y *Salmonella*

productor de BLEE / AmpC (Carattoli, 2008). A su vez, estos animales al ser reservorios de bacterias y de genes de resistencia, que al estar localizados en estructuras genéticas con una alta capacidad de movilización, pueden ser fácilmente diseminados entre bacterias de diferentes ecosistemas, incluso en el entorno humano. Del mismo modo ha aumentado el número de cepas de *E. coli* productor de BLEE aisladas de alimentos de origen animal (Bergenholtz *et al.*, 2009).

El presente estudio se enmarca en un proyecto cuyo objetivo principal ha sido determinar la prevalencia y caracterización de Enterobacterias productoras de enzimas  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en granjas avícolas en la Isla de Tenerife (España), debido a su enorme poder de diseminación, al aumento en la detección de este tipo de bacteria en la microbiota intestinal de humanos, y a la gran similitud con los entornos genéticos detectados en bacterias tanto de origen animal como humano, lo cual es esencial para conocer la verdadera dimensión del problema que representan, y limitar su diseminación.

## I.2. *Objetivos*

---

Los **objetivos** de este estudio son:

- **Primero:** determinar la prevalencia de colonización de Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (*BLEE*) existentes en exudados rectales de pollos vivos sanos en granjas avícolas de la Isla de Tenerife.
- **Segundo:** estudiar la prevalencia de la colonización de los pollos por Enterobacterias BLEE según las distintas granjas muestreadas.
- **Tercero:** determinar el perfil de resistencia a antimicrobianos del total de cepas aisladas y los patrones de resistencia predominantes.
- **Cuarto:** determinar el perfil de resistencia a antimicrobianos y los patrones de resistencia predominantes de cepas aisladas según las distintas granjas muestreadas.
- **Quinto:** establecer la relación epidemiológica de de las cepas aisladas mediante Electroforesis en gel de Campos Pulsante (PFGE).
- **Sexto:** Caracterización del gen  $\beta$ -lactamasa CTX-M (*bla<sub>CTM</sub>*) en las cepas productoras de enzimas mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a tiempo real.



## ***II. Revisión y antecedentes***

## II.1.

### Familia *Enterobacteriaceae*

---

#### 1. Familia *Enterobacteriaceae*

##### 1.1. Generalidades

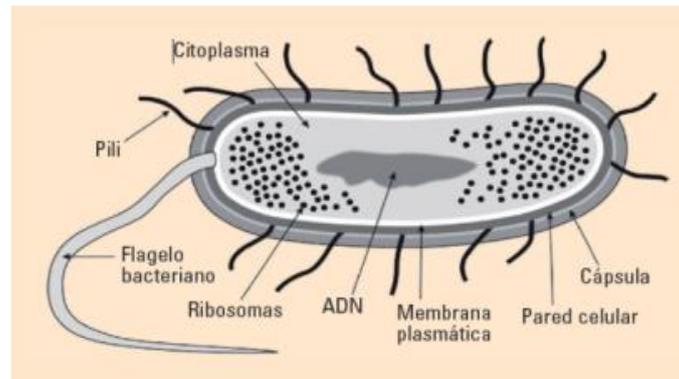
La familia *Enterobacteriaceae*, pertenece al dominio Bacteria, filo Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria, orden Enterobacteriales ([dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200210](https://doi.org/10.1007/bergeysoutline200210)) y comprende géneros y especies relevantes desde el punto de vista clínico enumerados en la tabla 2. Dentro de estos géneros, *Salmonella* y *Shigella* (en realidad no es un verdadero género, sino un patotipo de *Escherichia coli*) (Pupo *et al.*, 1997) y *Yersinia* presentan características distintivas e importancia medica particular. La familia *Enterobacteriaceae*, constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias gramnegativas, cuyo principal hábitat de muchos miembros de la familia, es el tracto gastrointestinal inferior de los humanos y otros animales, de ahí su nombre Enterobacteria (del griego enterón, intestino). Sin embargo, estos términos no son sinónimos, ya que diversas especies no habitan normalmente en el tracto gastrointestinal, y otro patógenos intestinales que no pertenecen a la familia, tales como *Vibrio spp.*, también se denominan bacterias entéricas. También esta designación oculta de que los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, se pueden localizar formando parte de la flora habitual o transitoria de la cavidad bucal, de regiones húmedas de la piel, del peritoneo, de las fosas nasales, de las vías genitales femeninas, sobre todo en mujeres que utilizan diafragmas u otro medio anticonceptivo como agentes espermaticidas, además se ha observado que mujeres en fase postmenopáusicas presentan un aumento de la tasa de colonización vaginal por *E. coli* y otros miembros de la familia (Raz *et al.*, 1993; Gupta *et al.*, 2000). Igualmente estos microorganismos se hallan muy dispersos en la naturaleza en particular en medios húmedos y, por habitar normalmente en el tracto

gastrointestinal al ser expulsadas por las heces, funcionan como mediadores epidemiológicos de salubridad e higiene poblacional.

### 1.2. Características antigénicas estructurales y de superficie.

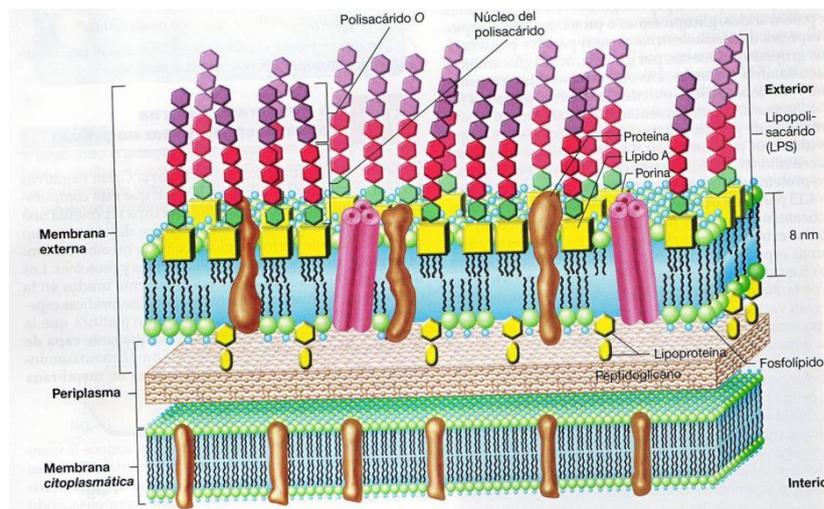
Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, son microorganismos con forma de bastón, por lo general de 1-3  $\mu\text{m}$  de largo y 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Son comunes los apéndices de superficie, incluidos pili y flagelos, y pueden ser numerosos. El citoplasma de los organismos enterobacterianos, no tiene orgánulos encerrados en su membrana, por tanto no hay núcleo, el genoma que suele estar formado por un cromosoma circular único puede englobar múltiples plásmidos de distintos tamaños, y se halla disperso en el interior del citoplasma. Asimismo, no existe retículo endoplasmático, de ahí que los ribosomas no se asocien a la membrana, y la respiración tiene lugar en la membrana citoplasmática, más que en las mitocondrias. (Figura 1)

Figura 1.- Estructura de una célula enterobacteriana  
Fuente <http://www.genomasur.com/lecturas/Guia01.htm>



Como en otras bacterias gramnegativas, las enterobacterias tienen tanto, membrana fosfolipídica interna como externa, que encierra un espacio periplásmico contenedor de la pared celular de peptidoglucano. (Figura 2)

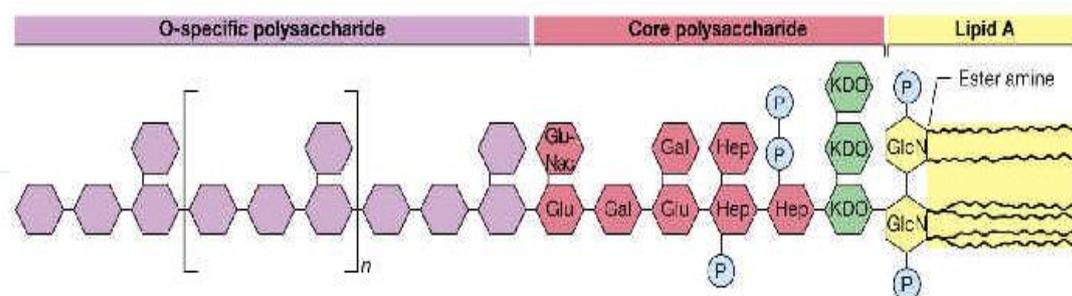
**Figura 2.-** Estructura de las envolturas de una bacteria gramnegativa como *E. coli*. En la parte inferior tenemos a la membrana citoplasmática. Envoltiéndola está la pared de peptidoglucano y finalmente la membrana externa. Los cuadrados amarillos con colas de hexágonos son el lipolisacárido. Fuente: Universidad a partir del Brock, *Biología de los Microorganismo 2004*.



**La pared celular** de las bacterias gramnegativas, está formada por **la membrana interna o citoplasmática**, que consiste en una doble capa de fosfolípidos impermeable a moléculas polares, regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas. Entre las membranas interna y externa se encuentra un espacio denominado espacio periplásmico que contiene el **periplasma**, un entorno acuoso que contiene una elevada concentración de proteínas y el **peptidoglucano** (Oliver *et al.*, 1996). El peptidoglucano también conocido como mureína, consiste en una envoltura delgada de aminoazúcares alternantes de *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico unido mediante enlaces  $\beta_{-1,4}$  con un péptido corto compuesto por L-alanina, ácido D-glutámico, ácido L-*meso*-diaminopimélico y D-alanina unida al grupo carboxilo del ácido murámico (Park 1996). Esta envoltura delgada es responsable de la forma y la estabilidad osmótica del microorganismo pero se modifica constantemente cada vez que la bacteria se alarga y divide. **La capa externa**, es una bicapa lipídica asimétrica. En esta capa los fosfolípidos se localizan casi de modo exclusivo en la hoja interna,

mientras que la hoja externa se compone mayoritariamente de **lipopolisacáridos**, lipoproteínas que están fijadas al peptidoglucano, proteínas porinas multiméricas, que regulan el paso de moléculas hidrofílicas, y facilitan el paso de diversas sustancias, incluidos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y otras proteínas integrales de la membrana externa (Koebnik *et al.*, 2000). **Los lipopolisacáridos (LPS)**, tienen tres dominios principales: el esqueleto de lípido A, el oligosacárido fosforilado central (core) y las cadenas laterales de oligosacárido de repetición (Raetz, 1996). (Figura 3)

**Figura 3.** Estructura química del lipopolisacárido de una bacteria gramnegativa. Fuente: Universidad de Granada a partir del Brock, *Biología de los Microorganismos* 2004.



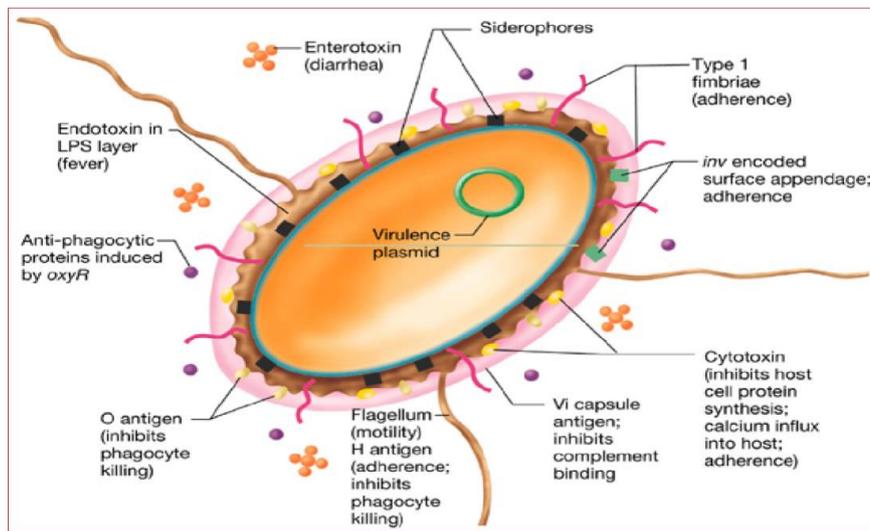
El **lípido A**, también conocido como endotoxina, es la parte biológicamente activa de la molécula que reconocen los receptores de patrón de reconocimiento del huésped. El oligosacárido de repetición unido al lipopolisacárido se conoce como **antígeno O**. Este antígeno O, es la base para la clasificación de los serogrupos. Hay más de 170 serogrupos distintos de *E. coli* (Ørskov *et al.*, 1992). El LPS es un componente esencial de la membrana externa de todas las bacterias gramnegativas, por esta razón hay quien sugeriría que el LPS no es un verdadero factor de virulencia. Sin embargo, las moléculas de LPS de distintos organismos tienen diferentes composiciones químicas, diversas actividades y potencia biológica, de ahí que los efectos del LPS sobre el huésped difieran en función de su fuente y composición química (Robert *et al.*, 1995). También entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, son comunes unas envolturas de polisacárido de superficie, **las cápsulas** que tiene capacidad antigénica (**antígeno K**, capsular) y que al parecer dotan de la capacidad de evitar la fagocitosis e

impedir la actividad bactericida del suero humano (Horwitz *et al.*, 1980; Russo *et al.*, 1993).

Otra característica es que suelen poseer **flagelos** peritricos de estructura proteica y de carácter antigénico (**antígeno H**, flagelar) que son apéndices superficiales flexibles que rotan e impulsan las bacterias a través del entorno líquido. La mayoría de las especies producen apéndices finos superficiales denominados **fimbrias**, con importante función en la adhesión a las células del huésped, la autoagregación y el intercambio genético mediante conjugación. (Figura 4)

Figura 4.- Estructura antigénica de las Enterobacterias

Fuente. [www.teclimza.com](http://www.teclimza.com)



Otros elementos que están omnipresentes en la familia *Enterobacteriaceae*, son **Los Plásmidos**, elementos de ADN extracromosómicos de replicación autónoma. Los plásmidos están especialmente bien adaptados para servir como elemento de intercambio genético y propagación de los genes de resistencia (Rice *et al.*, 2001). Los plásmidos son elementos genéticos que están formados por moléculas circulares de ADN bicatenario, cerradas de forma covalente y, cuya longitud varía desde 10 pares de kilobases hasta más de 400Kb (Barlow *et al.*, 2008). Todos los plásmidos poseen un sitio de replicación de la ADN polimerasa para unirse y replicar el ADN plásmido. Además de la resistencia antimicrobiana, los plásmidos pueden determinar una amplia variedad de funciones, incluida la virulencia y la capacidad metabólica. El

descubrimiento de los plásmidos en la década de los 70 supuso una revolución en el concepto de intercambio genético entre bacterias. Este concepto se amplió una década más tarde con la descripción de los primeros transposones (secuencias de ADN especializado) y más recientemente, la presencia de integrones que proporcionan un lugar de inserción conveniente a los genes de resistencia antimicrobiana de fuentes de ADN extraño, como elementos móviles de material genético en numerosas bacterias, lo que justifica la grandísima diseminación de genes de resistencia que hemos observado en los últimos años (Leverstein-Van *et al.*, 2003).

### 1.3. Características microbiológicas de la familia *Enterobacteriaceae*.

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* presentan ciertas características microbiológicas que se resumen en la Tabla 1.

Figura 5.- Microfotografía de bacilos gramnegativos. Tinción de Gram.

Fuente [www.bacteriainphotos.com](http://www.bacteriainphotos.com) (consultado 20/05/2013)



Tabla 1.- Principales características microbiológicas de la familia *Enterobacteriaceae*

#### Características típicas y distintivas de las Enterobacterias

- ✓ Bacterias Gram negativa. (Figura 5)
- ✓ Son anaerobios facultativos
- ✓ Reducen los nitratos a nitritos (con algunas excepciones).
- ✓ No licuan el alginato.
- ✓ Fermentan la glucosa a ácido con producción de gas o sin ella.
- ✓ Son oxidasa-negativos, a excepción de *Plesiomonas*.
- ✓ Producen catalasa.
- ✓ No ven favorecido su crecimiento por la presencia de Cloruro de Sodio (NaCl)
- ✓ La mayoría son móviles (con flagelos peritricos)
- ✓ No formadores de esporas
- ✓ La fermentación de la lactosa es una característica típica de las bacterias comensales del intestino humano y atípica de las bacterias patógenas como *Shigella* spp., *Salmonella* spp., y *Yersinia* spp.

#### 1.4. Géneros y especies de Enterobacterias con importancia clínica

La familia *Enterobacteriaceae* comprende géneros y especies relevantes desde el punto de vista clínico enumerados en la Tabla 2.

Tabla 2.- Géneros y especies de Enterobacterias con importancia clínica

Género	Especies
<i>Escherichia</i>	<i>coli, alberti</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae, oxytoca, granulomatis</i>
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes, cloacae</i>
<i>Cronobacter</i>	<i>sakazakii</i>
<i>Serratia</i>	<i>marcencens</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii, amalonaticus, koseri</i>
<i>Hafnia</i>	<i>alvei</i>
<i>Yersinia</i>	<i>pestis, enterocolitica, pseudotuberculosis</i>
<i>Proteus</i>	<i>mirabilis, vulgaris</i>
<i>Providencia</i>	<i>rettgeri, stuartii</i>
<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>
<i>Shigella (pertenece a la especie E. coli)</i>	<i>dysenterii, flexneri, sonnei, boydei</i>
<i>Plesiomonas</i>	<i>shigelloides</i>
<i>Edwardsiella</i>	<i>tarda</i>
<i>Pantoea</i>	<i>agglomerans</i>

#### 1.5. Procesos infecciosos

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* causan una amplia variedad de infecciones tanto en la comunidad como en el ámbito hospitalario que afectan a huéspedes sanos y a aquellos con enfermedades preexistentes. Son los gramnegativos los más frecuentes en la inmensa mayoría de los aislados urinarios y una gran proporción de los aislados a partir de las muestras de sangre, la cavidad peritoneal y las vías respiratorias. Pueden aislarse de otros lugares, entre ellos el líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial y los abscesos.

En la Tabla 3, vienen reflejadas las infecciones ocasionadas por miembros de la familia *Enterobacteriaceae* más frecuentes según su localización y prevalencia.

Tabla 3.- Localizaciones de infecciones más frecuentes por Enterobacterias por orden de prevalencia

Localización	Enterobacterias más frecuentes
Sistema nervioso central	<i>Escherichia</i>
Tracto respiratorio inferior	<i>Klebsiella, Enterobacter, Escherichia</i>
Torrente sanguíneo	<i>Escherichia, Klebsiella, Enterobacter</i>
Tracto digestivo	<i>Salmonella, Shigella, Escherichia, Yersinia</i>
Tracto urinario	<i>Escherichia, Proteus, Klebsiella, Morganella</i>

### 1.6. Epidemiología

El hábitat de las diferentes especies de enterobacterias es muy diverso y heterogéneo. Aunque el hábitat natural de muchos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* de significación clínica es el tracto gastrointestinal inferior de los humanos y otros animales, también los podemos encontrar en el agua y el suelo. En algunos individuos entre ellos hospitalizados o inmunodeprimidos (incluyendo los pacientes alcohólicos y diabéticos), y en especial los pacientes que reciben tratamiento antibiótico, presentan tasas elevadas de colonización por miembros de esta familia (Mackowiak 1978). Por otra parte, las especies enterobacterianas colonizan con rapidez la orofaringe de numerosos pacientes hospitalizados con independencia de que reciban o no tratamiento antimicrobiano (Johanson 1969). Las mujeres que utilizan diafragmas y/o agentes espermaticidas como anticonceptivos y las posmenopáusicas presentan un aumento de las tasas de colonización vaginal por *E. coli* y otros miembros de esta familia (Raz 1993; Gupta 2000). El extenso nicho que las *Enterobacteriaceae* pueden ocupar en tales circunstancias, es un factor de predisposición relevante que permite que se produzcan ulteriores infecciones extraintestinales.

Los animales son reconocidos como un depósito para cepas patogénicas *E. coli*. Desde tiempos inmemoriales, los animales han sido una fuente importante de la enfermedad infecciosa humana, (Lederberg 2000), por ello los patógenos de origen animal constituyen actualmente el grueso de las enfermedades emergentes (Weiss 2001).

### 1.7. Virulencia y Factores de Virulencia

La virulencia designa el carácter patogénico de un microorganismo, es decir, su capacidad de causar enfermedad. La capacidad de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* para causar enfermedades es muy variable; ella engloba flora comensal, rara vez perjudicial, patógenos oportunista susceptibles de ocasionar una morbilidad y una mortalidad considerable en huéspedes comprometidos y patógenos potentes capaces de provocar enfermedades en huéspedes en perfecto estado de salud. Al considerar los factores de virulencia, resulta útil observar las fases del ciclo infeccioso producido por la mayoría de microorganismos patogénicos. Estas fases comprenden la entrada, establecimiento y multiplicación, evasión de los mecanismos de defensa del huésped, lesión tisular y salida (Schreiber *et al.*, 1995). Entre los factores de virulencia están: las adhesinas, las toxinas, los sistemas de captación de hierro, plásmidos, lipolisacáridos y cápsulas. **Adhesinas**, parte del dogma aceptado de la patogenia microbiana mantiene que la adherencia inicial del patógeno a las células huésped es un requisito previo absoluto para la enfermedad. Los patógenos enterobacterianos pueden producir una variedad de adhesinas, incluidas fimbrias y proteínas de membrana externa. En algunos casos, los hidratos de carbono de la superficie también pueden tener propiedades adhesivas. **Adquisición de hierro**, el hierro es un elemento esencial, necesario para casi todos los microorganismos como un cofactor para varias enzimas indispensables. Aquellos que colonizan las superficies o invaden los tejidos de mamíferos deben competir con sus huéspedes para adquirir hierro libre, mantenido por el huésped a concentraciones extremadamente bajas gracias al uso de proteínas que se unen al hierro, como transferrina y lactoferrina. Por tanto, los patógenos enterobacterianos han desarrollado diversos sistemas muy eficientes que rescatan hierro. Muchos miembros de la familia producen un sideróforo codificado cromosómicamente, conocido como enterobactina (Higgins *et al.*, 2004). Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular que quelan hierro y que los microorganismos sintetizan, secretan y vuelven a capturar. Muchos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* generan **toxinas** susceptibles de causar lisis de las células

huésped. Las cepas que producen estos factores inducen a menudo zonas de hemólisis en placas de agar sangre, de modo que las toxinas se denominan a menudo hemolisinas. **Los plásmidos** bacterianos son, elementos extracromosómicos auto-replicante, agentes clave del cambio en las poblaciones microbianas. Ellos promueven la difusión de una variedad de características, incluyendo la virulencia, mejoría del estado físico, la resistencia a los agentes antimicrobianos, y el metabolismo de sustancias raras. Tales elementos genéticos móviles son factores relevantes que contribuyen a la rápida evolución de aislados sumamente resistentes a los antibióticos y posterior diseminación dentro de la familia enterobacteriana (Leverstein-van *et al.*, 2003). **Lipopolisacáridos**, como ya hemos mencionado el lipopolisacárido es un componente esencial de la membrana externa de todas las bacterias gramnegativas pero las moléculas de LPS varían en su composición química y potencia biológica en los distintos organismos lo que ocasiona efectos diferentes sobre el huésped, y en el caso de las **cápsulas** se ha comprobado en el caso de *Klebsiella pneumoniae* que tienen un papel importante para la colonización del tracto urinario ( Struve *et al.*, 2003; Buckes *et al.*, 2009) y en la infecciones sistémicas (Russo *et al.*,1994).

## 1.8 Patógenos específicos

### **Salmonella**

Se trata de un género de enterobacterias no formadores de esporas, anaerobias facultativas y móviles. Son oxidasa negativa y prácticamente todas lactosa negativas (Farmer 1995). La salmonelosis puede observarse bajo cinco diferentes síndromes clínicos, que se presentan de forma exclusiva o superpuesta, y que corresponden a los siguientes: portador asintomático, gastroenteritis aguda, bacteriemia (la presencia de una bacteriemia por *Salmonella* obliga a descartar la existencia de una infección por el VIH), infecciones focales (meningitis, osteomielitis o abscesos) y fiebre tifoidea. La fiebre tifoidea es una enfermedad sistémica febril causada por *S. typhi*, *S. paratyphi* y ocasionalmente, *S. typhimurium* (Hornick *et al.*, 1970). El reservorio es el hombre enfermo y el portador crónico que elimina bacilos por las heces, produciéndose transmisión fecal-oral.

***Enterobacter, Pantoea, Serratia, Citrobacter y Hafnia***

Los microorganismos que pertenecen a los géneros *Enterobacter*, *Pantoea*, *Serratia* y *Citrobacter*, rara vez causan infecciones en huéspedes sanos, pero son aislados nosocomiales frecuentes.

- ***Enterobacter***

Hasta la década de 1960 estos microorganismos estaban agrupados en la clasificación de *Klebsiella-Aerobacter*. Especies como *E. cloacae*, *E. aerogenes*, son responsables de la mayoría de infecciones por *Enterobacter*. Estas bacterias fermentan la lactosa, son móviles y forman colonias mucoides. Las cepas de *Enterobacter* suelen colonizar a los pacientes hospitalizados, y las infecciones son comunes sobre todo en los tratados con antibióticos y en aquellos en unidades de cuidados intensivos (Sanders *et al.*, 1997) y han sido asociados con infecciones de las vías respiratorias, del tracto urinario de quemaduras, y de heridas.

- ***Pantoea agglomerans*** (anteriormente *Enterobacter agglomerans*)

Es un bacilo gramnegativo, causa fundamentalmente infecciones nosocomiales, aunque también se han descrito casos de meningitis neonatal y de artritis séptica (Kratz *et al.*, 2003; Mensa *et al.*, 2004). Puede crecer en medios ricos en glucosa, por lo que ocasionalmente produce infecciones relacionadas con la infusión intravenosa de sueros, que pueden originar brotes de bacteriemia en los hospitales (Aguado *et al.*, 1998). Se ha referido un aumento de las resistencias de este microorganismo a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, lo que puede motivar el empleo de los carbapenémicos en ciertos casos (Aguado *et al.*, 1998).

- ***Serratia***

Se trata de microorganismos oportunistas, móviles y que fermentan la lactosa con lentitud o no la fermentan. *Serratia marcescens*, es la especie principal relacionada con las enfermedades humanas. Se han comunicado raros casos de enfermedades debidas a *Serratia liquifaciens*, *Serratia raubidaea* y *Serratia odorifera*. Entre las infecciones nosocomiales *Serratia* provoca aproximadamente el 4% de las bacteriemias y las infecciones del tracto respiratorio inferior y el 2% de las

infecciones de las vías urinarias, heridas quirúrgicas y piel (Acar 1986). El tratamiento antibiótico de las infecciones por *Serratia* es complicado por la frecuencia elevada de resistencia a múltiples fármacos.

- ***Hafnia***

Aunque en su momento se consideró miembro del género *Enterobacter*, *Hafnia* se define como un género separado, con una única especie, *Hafnia alves*. Reside en el tracto gastrointestinal del ser humano y de muchos animales (Janda *et al.*, 2006). Son bacterias móviles pero no fermentan la lactosa. Se asocia a infecciones nosocomiales. La sensibilidad a los antibióticos parece ser similar a la observada entre los microorganismos del grupo *Enterobacter*.

- ***Citrobacter***

Los miembros del género *Citrobacter* se denominan así por su capacidad para usar citrato como su única fuente de carbono. Se diferencian por su capacidad para convertir el triptófano en indol, fermentar la lactosa y utilizar malonato (Lipsky *et al.*, 1980). *C. freundii* produce H<sub>2</sub>S de ahí que pueda confundirse con *Salmonella*. El tracto urinario es el lugar de origen más frecuente de los cultivos de *Citrobacter*, a menudo asociado a un catéter insertado. Estas bacterias también pueden cultivarse a partir de las vías respiratorias, un hallazgo que representa con más frecuencia colonización que infección sintomática. Las cepas de *C. freundii* tienen genes ampC inducibles que codifican la resistencia a la ampicilina y cefalosporinas de primera generación que pueden producirse de manera constitutiva a altas concentraciones tras mutaciones, además los aislados de *Citrobacter* pueden ser resistentes a otros múltiples antibióticos debido a genes de resistencia codificados por plásmidos.

***Yersinia***

Para el hombre los microorganismos patógenos son *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolítica* y *Yersinia pseudotuberculosis* (Bottone 1997). Se trata de zoonosis que habitualmente afectan a roedores, cerdos y aves, siendo el ser humano un huésped accidental de la infección. *Y. pestis* se desarrolla de forma aerobia en la mayoría de los

medios de cultivo y no fermenta la lactosa. Es el agente etiológico de la peste, enfermedad que se considera erradicada en España.

### ***Proteus, Providencia y Morganella***

Estos géneros son lactosa negativa, móviles y producen fenilalaninidasa. Hay varias especies de *Proteus*, pero *P. mirabilis* y *P. vulgaris* representan la inmensa mayoría de los aislados clínicos en este género. Ambos producen ureasa, y el último es indol positivo. Producen H<sub>2</sub>S. Se diferencian de los bacilos enterobacterianos típicos al expresar fimbrias y flagelos para dar bastones muy alargados con miles de flagelos que translocan con rapidez a través de la superficie de placas de agar. Las Infecciones del tracto urinario (ITU) causadas por *Proteus* spp. tienden a ser más graves que las producidas por *E. coli*, con una proporción superior de pielonefritis. (Fairley *et al.*, 1971). *Providencia stuartii* es un microorganismo que rara vez se aísla en la clínica, excepto a partir de la orina de enfermos en residencias o en ancianos con catéteres urinarios insertados durante largo plazo. *Morganella morganii*, es el único miembro de su género, aislado nosocomial poco común, en general de orina o heridas, poseen β-lactamasa *AmpC* inducibles de ahí que sean intrínsecamente resistentes a ampicilina y cefalosporinas de primera generación (Poirel *et al.*, 1999)

### ***Shigella***

*Shigella*, especialmente *S. flexneri* y *S. sonnei* pueden causar enfermedades que van desde diarrea leve, autolimitada a la disentería severa con presencia frecuente de sangre y moco, fiebre alta, calambres, y en casos raros, bacteriemia. Las complicaciones de la shigelosis se ven con mayor frecuencia en los niños, los ancianos y los inmunocomprometidos. La resistencia a múltiples fármacos en *Shigella* es un problema emergente por lo tanto, la shigelosis es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las principales preocupaciones de salud pública a nivel mundial (Salam *et al.*, 1991; Sivapalasingam *et al.*, 2006).

***Edwardsiella tarda***, se encuentra en entornos de agua dulce, puede causar infecciones de las heridas y bacteriemia con una elevada mortalidad, sobre todo en pacientes con enfermedad hepática y sobrecarga de hierro (Janda 1993). ***Plesiomonas shigelloides*** es otro microorganismo encontrado en el agua que se ha asociado a diarrea y, en raras ocasiones, a infecciones extraintestinales. Dada la producción de  $\beta$ -lactamasas, la mayoría de los aislamientos actuales son resistentes a las penicilinas. ***Ewingella americana*** es una causa muy rara de bacteriemia nosocomial, peritonitis asociada a diálisis peritoneal y conjuntivitis. Las infecciones causadas por microorganismos que pertenecen al género ***Kluyvera*** son infrecuentes. Se han aislado en orina, esputos o heridas y en muchos casos no está clara la importancia patológica de su presencia.

### ***Klebsiella***

El género *Klebsiella* está constituido por *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *K. granulomatis*. Los microorganismos antes conocidos como *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis* se consideran subespecies que no fermentan de *K. pneumoniae*, las cuales se asocian a manifestaciones clínicas características. *Klebsiella pneumoniae* es el principal patógeno humano. A excepción de las dos subespecies citadas todos los miembros de este género fermentan la lactosa, citrato, ureasa positiva e hidrolizan la esculina, la mayoría produce colonias sumamente mucoides (Figura 6), debido a la producción de una cápsula de abundante polisacárido abundante (Janda 2006), y todas se caracterizan por ser inmóviles.



**Figura 6.-** Colonias de *Klebsiella pneumoniae* en MacConkey agar Fuente [www.bacteriainphotos.com](http://www.bacteriainphotos.com)

## Epidemiología

*K. pneumoniae* es un microorganismo ubicuo cuyo hábitat natural engloba la tierra, las plantas, superficies húmedas y el intestino de los mamíferos. En el hombre *K. pneumoniae*, está presente como saprófito en la nasofaringe y en el tracto gastrointestinal, mientras que solo se considera un colonizador transitorio de la piel. El porcentaje de detección de *K. pneumoniae*, en las heces de pacientes sanos oscila de 1 a un 6%. Las tasas de colonización se elevan considerablemente en pacientes hospitalizados o sometidos a tratamientos con antibióticos, llegando a ser del 77% en heces, del 19% en la nasofaringe y del 42% en las manos de los pacientes. Por otro lado, *K. pneumoniae* está muy bien adaptado al medio hospitalario por tener mayor capacidad que otras enterobacterias para sobrevivir en las manos del personal sanitario y pacientes y su facilidad para ser transmitida entre pacientes, lo que hace que sea una de las especies más implicadas en brotes nosocomiales (Podschun *et al.*, 1998). En el medio hospitalario el principal reservorio lo constituye el tracto gastrointestinal de los pacientes y las manos del personal sanitario. Los pacientes colonizados a menudo son asintomáticos y actúan como fuente de infección para otros pacientes que en caso de ser vulnerables podrían desarrollar infecciones clínicas (Csewell & Philipps 1981).

## Tipificación

La tipificación de *K. pneumoniae* suele basarse en la presencia de antígenos capsulares de los que se han descrito hasta 77 variedades antigénicas, que permiten tipificar la mayor parte de los aislados clínicos. Actualmente se prefiere recurrir a técnicas de genotipado como la electroforesis en gel de campos pulsados o la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) (Mantilla *et al.* 2004).

## Factor de virulencia

El principal factor de virulencia descrito para *Klebsiella pneumoniae* es su cápsula de polisacáridos que protege a la bacteria de la acción fagocítica de neutrófilos y de la acción bactericida del suero mediada por el complemento, como también se cree que sucede con algunos antígenos somáticos. Las cepas que expresan los antígenos K<sub>1</sub> y K<sub>2</sub>

parecen ser especialmente virulentas y se cree que el grado de virulencia conferido por un antígeno capsular depende de su contenido en manosa.

*Klebsiella pneumoniae* posee tres tipos de fimbrias, siendo las de tipo I las responsables de la unión al mucus y células epiteliales del tracto urogenital, respiratorio y tracto gastrointestinal que juega un importante papel en la patogénesis de las infecciones del tracto urinario y la neumonía.

Para asegurarse el aporte necesario de hierro, muchas bacterias, entre las que se encuentra *Klebsiella pneumoniae* secretan quelantes de hierro de bajo peso molecular denominados sideroforos que son capaces de competir con las proteínas de huésped en la cadena de hierro. Los sideroforos presentes en *Klebsiella pneumoniae* son la enterobactina y la aerobactina (Podschun & Ullmann 1998).

*Klebsiella oxytoca*, al igual que *K. pneumoniae*, pueden provocar una variedad de infecciones nosocomiales. Se distingue de *K. pneumoniae* por su capacidad para producir indol a partir de triptófano. Así mismo, puede ser resistente a múltiples antibióticos. Hay pruebas de que la *Klebsiella oxytoca* puede causar colitis hemorrágica asociada al uso de antibióticos (Högenauer *et al.*, 2006).

### Manifestaciones Clínicas

*K. pneumoniae* es un importante agente etiológico de infección del tracto urinario y neumonía en pacientes previamente sanos. Además de la neumonía y la infección del tracto urinario otras infecciones producidas por esta especie son las infecciones de herida, infecciones relacionadas con dispositivos intravasculares y otros dispositivos invasivos, infecciones de vías biliares, peritonitis y meningitis. *K. pneumoniae* es después de *E. coli* es el principal agente de bacteriemia por gramnegativos (Donnenberg 2010).

Una forma emergente de infección comunitaria por *K. pneumoniae* son abscesos hepáticos piogénicos con o sin metástasis sépticas, que se vienen describiendo desde hace 20 años, particularmente en Taiwan, pero también en Asia, Europa y América del Norte.

### Resistencia antibiótica

Todos los aislados de *Klebsiella pneumoniae* son intrínsecamente resistentes a amino penicilinas como resultado de la presencia de un gen cromosómico codificador de una  $\beta$ -lactamasa específica SHV<sub>1</sub> con actividad preferentemente penicilinas que es eficazmente inhibida por ácido clavulánico.(Haeggman *et al.*, 1997).

Una de las principales características de *Klebsiella pneumoniae* es su facilidad para diseminarse clonalmente y producir brotes nosocomiales, probablemente por su capacidad de sobrevivir en la piel, así como para adquirir determinantes de resistencia de codificación plasmídica y transferirlos a otras especies.

De acuerdo a los datos de la red de vigilancia a los antimicrobianos *EARS-Net* (European antimicrobial resistance surveillance system) España, el porcentaje de aislados invasivos de *Klebsiella pneumoniae* productores de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido se ha mantenido estable en los últimos años y en el año 2010 se situaba próxima al 10%, un dato similar al de los países de nuestro entorno.

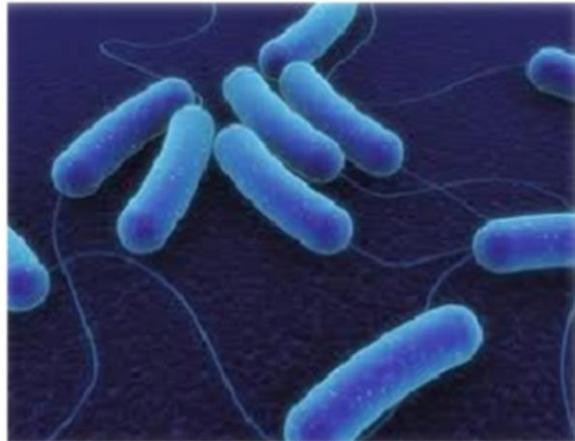
### ***Escherichia coli***

Es el microorganismo más prevalente de la familia de *Entero bacteriácea*. La estudiaremos más detalladamente en el siguiente apartado.

## II.2.

### Especie *Escherichia coli*

---



#### 2.1. Generalidades

*Escherichia coli* es la especie típica del género *Escherichia*, que a su vez es el género típico de la familia *Enterobacteriaceae*. Fue descrita por primera vez en el siglo XIX por el Dr. Theodore Escherich. *E. coli* es tanto la especie más frecuente de anaerobio facultativo encontrada en el tracto gastrointestinal humano como el patógeno de la familia enterobacteriana hallado con más frecuencia. En general, *E. coli* se distingue de otros miembros de la familia por la capacidad de la mayoría de las cepas para fermentar la lactosa y otros azúcares y para producir indol a partir de triptófano, además casi todas las cepas son móviles. En la Figura 7 y 8 se observa el crecimiento de colonias de *E. coli* en los medios de cultivo agar sangre y en medio selectivo MacConkey agar respectivamente. Es la especie bacteriana predominante de la microbiota normal del aparato digestivo de la mayor parte de los animales y del hombre (Margall *et al.*, 1997; Schroeder *et al.*, 2004; Todar 2008).



Figura 7. - Colonias de *Escherichia coli* en agar Sangre  
Fuente [www.bacteriainphotos.com](http://www.bacteriainphotos.com)



Figura 8.- Colonias de *Escherichia coli* en MacConkey agar  
Fuente [www.bacteriainphotos.com](http://www.bacteriainphotos.com)

## 2.2. Epidemiología

*Escherichia coli* es el principal anaerobio facultativo de la flora microbiana que reside en el intestino humano y de animales formando parte de la flora nativa intestinal y se encuentra en calidad de saprobio sin causar daño. Por el contrario muchas cepas de *E. coli* producen sustancias que son útiles al hospedero, como son las colicinas, que tienen un efecto inhibitorio sobre otras cepas potencialmente patógenas, por lo que la colonización del intestino es beneficiosa para el hospedador. El huésped se coloniza desde el nacimiento con una o dos cepas que residen de manera permanente en el intestino y establecen una relación simbiótica con el individuo durante toda la vida (Winfield *et al.*, 2003; Kaper *et al.*, 2004). Mientras que la mayoría de las cepas de *E. coli* residen sin causar daño en la luz del colon en individuos sanos existe un grupo abundante de patotipos susceptibles de causar tipos específicos de enfermedad tanto en huéspedes sanos como en aquellos con mecanismos de defensa inespecíficos comprometidos.

*E. coli* es una bacteria comensal en el intestino de las aves de corral, ganado vacuno, y cerdos que se utilizan para la producción de alimentos. Los alimentos de origen animal pueden contaminarse con *E. coli* durante la masacre de los animales. *E. coli* encontrada en carne sobre todo, ha sido asociada con cepas patógenas intestinales *E. coli* (por ejemplo, los patotipos enteropatogénica, enterotoxigénica, y verotoxigénica). Recientemente se ha demostrado que cepas de *E. coli* de origen animal se asocian con infecciones extra-intestinales, tales como infecciones del tracto urinario (Johnson *et al.*, 2005).

La transmisión de patógenos *E. coli* a menudo se produce a través de la transmisión fecal-oral (Kaper *et al.*, 2004), Las vías comunes de transmisión son: la preparación de alimentos insalubres, la contaminación agrícola, debido a la fertilización con estiércol, el riego de los cultivos contaminados con aguas residuales, o el consumo directo de agua contaminada con restos fecales, también han sido transmitidas por las moscas, así como el contacto directo de hombre a hombre y a través de los animales de granja, (Rahn *et al.*, 1998; Trevena *et al.*, 1999). Se ha evidenciado que los lácteos y carne son reservorios primarios de cepas de *E. coli* O157: H7 (Bach *et al.*, 2002),

De acuerdo con la Administración de Drogas y Alimentos de EE.UU., el ciclo fecal-oral de transmisión puede ser interrumpida por cocinar bien los alimentos, evitando la contaminación cruzada, la institución de barreras, como guantes para los trabajadores de alimentos, las políticas de salud para empleados de la industria de alimentos, la pasteurización de jugo o productos lácteos y los requisitos apropiados de lavado de manos (Centro para la Seguridad Alimentaria y la Nutrición Aplicada de EE.UU. 2006).

### 2.3. Clasificación

Herzer y colaboradores desarrollaron en 1990, un sistema de clasificación basado en el análisis de los patrones de movilidad electroforética de 38 enzimas metabólicas (<http://www.bio.psu.edu/People/Faculty/Whittam/Lab/ecor/>) de la estructura

poblacional de una colección de 72 cepas de referencia de *Escherichia coli* de muy diversos orígenes (Ochman & Selander 1984). Los análisis filogenéticos de esta colección revelaron 4 grupos filogenéticos principales, designados como A, B1, B2 y D (Herzer *et al.*, 1990).

Por otra parte, en **función de su patogenicidad**, se pueden distinguir cepas de *E. coli* comensales y cepas *E. coli* patógenas. Las cepas de ***E. coli* comensales** constituyen gran parte de la microbiota del intestino de humanos sanos, mamíferos y aves. Son cepas perfectamente adaptadas a la coexistencia con su hospedador, raramente son patógenas y no desarrollan sintomatología en dicho hospedador, excepto en casos de inmunodepresión. Típicamente pertenecen a los grupos filogenéticos A y B1 y se caracterizan por carecer de muchos de los determinantes de virulencia que están presentes en **cepas patógenas** (Russo & Johnson, 2000). La mayoría de las cepas de *E. coli* comensales como ya se ha descrito residen sin causar daño en la luz del colón en individuos sanos a diferencia de las cepas de ***E. coli* patogénicas** que producen factores de virulencia específicos para cada patotipo, que pueden ser codificados por bacteriófagos, en plásmidos o en fragmentos del cromosoma conocidos como islas de patogenicidad.

### 2.3.1. Patotipos patógenos

Las cepas patógenas de *E. coli* se han dividido en diferentes patotipos según su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico (Kaper *et al.*, 2004; Kaper *et al.*, 2005). Se ha precisado que siete grupos patógenos o patotipos de *E. coli* ocasionan diarrea en sujetos sanos: *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET), *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI), *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), *Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA), *Escherichia coli* adherente difusa (ECAD), *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP), y *Escherichia coli* patogénica extraintestinal (ExPEC) (Kaper 2004). Tabla 4.

Tabla 4.- Características clínicas de los patotipos de *Escherichia coli*

Patotipo	Enfermedad	Asociada virulencia del plásmido
<b>ECET</b> <i>E. coli enterotoxigénica</i>	Diarrea acuosa	Plásmidos que codifican factores de colonización y toxinas
<b>ECEA</b> <i>E. coli enteroagregativa</i>	La diarrea persistente	Plásmidos que codifican factores de adherencia y toxinas
<b>ECEI</b> <i>E. coli enteroinvasiva</i>	Diarrea acuosa, colitis inflamatoria o disentería	Invasión plásmido
<b>ECEH</b> <i>E. coli enterohemorrágica</i>	Diarrea sin sangre, HC, o HUS	Plásmidos que codifican las toxinas (pO157)
<b>ECEP</b> <i>E. coli enteropatogénica</i>	Diarrea sin sangre	Plásmido EAF
<b>ECAD</b> <i>E. coli de adherencia difusa</i>	Diarrea sin sangre	
<b>ExPEC</b> <i>E. coli patogénica extraintestinal</i>	UTI, sepsis, meningitis neonatal, o colibacilosis aviar	ColV y plásmidos Vir

- ***Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET)**

Podría decirse que la diarrea causada por ECET humano es la enfermedad más común causada por el cepas de *E. coli*. Se estima que hay más de 650 millones de casos de infección a cada año, lo que resulta en casi 800.000 muertes (Qadri *et al.*, 2005). Las cepas ECET en humanos se adquieren a través de la ingestión o la manipulación de alimentos y agua contaminada. Después de la infección, tienen un inicio rápido de diarrea acuosa que es generalmente auto limitante, pero pueden causar deshidratación siendo potencialmente mortal. Ocasionalmente los síntomas pueden cursar, con fiebre, escalofríos y vómitos. Es una de las causas más frecuentes de deshidratación por diarrea en niños de menos de dos años (Black *et al.*, 1982), y es la principal causa de la diarrea del viajero, que en general se desarrolla en un individuo sano proveniente de un país industrializado que visita regiones tropicales subtropicales caracterizadas por condiciones de higiene deficientes (Turner *et al.*, 2006).

- ***Escherichia coli* enteroagregativo (ECEA).**

Las cepas ECEA, se definen por su patrón agregativo de adherencia a las células de cultivos tisulares. Puede considerarse una verdadera infección emergente verdadera. Los estudios han relacionado las cepas de *E. coli* enteroagregativa (ECEA) con diarrea aguda y crónica en los países en vías de desarrollo y diarrea aguda en países desarrollados (Nataro 1987).

- ***Escherichia coli* enteropatógeno (ECEP)**

Es una causa importante de diarrea en neonatos en los países subdesarrollados, causando enfermedad muy raramente en adultos en el mundo desarrollado (Rothbaum *et al.*, 1982). Producen una lesión típica en la mucosa intestinal, con la formación de microcolonias y la pérdida de las microvellosidades adyacentes. Clínicamente se caracteriza por producir diarrea acuosa con más o menos fiebre o vómitos. El diagnóstico de infecciones por *E. coli* enteropatógena (ECEP) radica en la detección de los genes codificadores de los factores de virulencia específicos mediante el uso de sondas de ADN o PCR. Para su prevención son diversos los estudios que han demostrado el importante papel de la lactancia materna en los primeros seis meses de vida.

- ***Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI).**

Las cepas de *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), son muy similares a las cepas de *Shigella* en cuanto a características y patogenia. Al igual que la *Shigella* las cepas de ECEI tienen un gran plásmido de invasión que permite a las bacterias invadir las células epiteliales, escapar del fagosoma, multiplicarse en el citoplasma y diseminarse directamente de célula a célula. A diferencia de la mayoría de las *E. coli*, tanto cepas de ECEI como de *Sisella* suelen ser inmóviles, no pueden fermentar la lactosa y, debido a una detección cromosómica, son lisinas descarboxilasa negativas (Maurelli *et al.*, 1998). Se distinguen sobre todo de *Sisella* porque las cepas de ECEI fermentan la glucosa y la lactosa (Dsy *et al.*, 2002). Así como la *Shigella* las ECEI puede conducir a diarrea acuosa, susceptibles de progresar a disentería, caracterizada por fuertes calambres abdominales, una incidencia elevada de fiebre y diarrea sanguinolenta.

- ***Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)**

Estas cepas producen toxinas de tipo *Shiga* (también denominadas verotoxinas), son citotoxinas codificadas por bacteriófagos que bloquean la síntesis de proteínas e inducen la muerte de la célula huésped. Las cepas que producen toxinas *Shiga* pueden causar enfermedad de grado variable como diarrea acuosa, diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica (HC), síndrome hemolítico urémico (SHU) y muerte (Griffin *et al.*, 1988). Entre las cepas de *E. coli* que generan toxinas *Shiga* (ECTS), aquellas que comparten las cepas de ECEP la capacidad para provocar el efecto de fijación y borramiento codificado por la isla de patogenicidad locus de borramiento de enterocitos se conocen como *E. coli* enterohemorrágicas (ECEH). Las cepas de ECEH, sobre todo las que pertenecen al serotipo O157:H7, han sido responsables de grandes brotes de infección con tasas más elevadas de complicaciones y parecen más patogénicas que cepas de ECTS no ECEH. El reservorio de cepas ECEH es el tracto gastrointestinal de ganado joven y otros mamíferos y herbívoros grandes pero estas pueden vivir durante largos periodos en el mar incluso con pH muy bajos y pueden proliferar en vegetales y otros alimentos y bebidas. Los brotes suelen relacionarse con el consumo de carne picada poco cocinada o productos agrícolas, pero pueden aparecer a partir de una amplia variedad de otras fuentes de alimentos, agua potable y de recreo por contacto con animales mediante contacto directo de persona a persona (Bell *et.al.*, 1994; Jay *et al.*, 2007).

También hay cepas de *Escherichia coli* productora de la toxina *Shiga* perteneciente al serotipo O104:H4, que tiene factores de virulencia característicos del Patotipo de *E. coli* enteroagregativa, que han causado el reciente brote en Alemania (2011). La cepa además presenta varios factores de virulencia de cepas de *E. Coli* patógenas extraintestinales y ha adquirido resistencia a numerosos antibióticos, incluidas las cefalosporinas de tercera generación, ya que presenta un plásmido que lleva genes que codifican para las  $\beta$ -lactamasas TEM<sub>-1</sub> y CTX-M<sub>-15</sub>. Hay muy pocos reportajes previos sobre el serotipo O104:H4; es muy raro en humanos y nunca se detectó en animales ni alimentos (Bielaszewska *et al.*, 2011; Scheutz *et al.*, 2011).

- ***E. coli* patogénica extraintestinal (ExPEC)**

Designa las cepas con potencial para causar diversas infecciones extraintestinales (Russo *et al.*, 2000). Son un amplio grupo de agentes patógenos que colonizan el compartimento extraintestinal de huéspedes humanos y animales. Extraintestinales patógenas de *Escherichia coli* (ExPEC) son una causa importante de infecciones del tracto urinario (IUT), meningitis neonatal y septicemia en humanos (Smith *et al.*, 2007). El aislamiento de una cepa de *E. coli* de un paciente con una infección extraintestinal no determina que dicha cepa sea ExPEC, ya que cualquier cepa comensal de *E. coli* puede causar infección extraintestinal si el huésped está inmunológicamente comprometido. Designaciones más restrictivas son utilizadas para patotipos causantes de síndromes específicos: a) UPEC (*Uropathogenic Escherichia coli*), principal causante de las infecciones en el tracto urinario, la cual presenta múltiples adhesinas y toxinas específicas de este patotipo y b) BMEC (*Bacterial Meningitis Escherichia coli*) principal agente de meningitis en recién nacidos. Este patotipo puede atravesar la barrera hematoencefálica provocando un proceso de inflamación de las meninges en el caso de los neonatos. La mayoría de estas cepas ExPEC son patógenos oportunistas que infectan a estadios posteriores al stress, siendo el lugar de infección no necesariamente el de la colonización.

#### 2.4. Animales como reservorios de *E. coli*

Los animales son reconocidos como un reservorio de cepa *E. coli* patogénica extraintestinal (ExPEC). Patologías causadas por ExPEC en animales de granja, especialmente en aves de corral, como el caso de la colibacilosis que es responsable de enormes pérdidas en los pollos de engorde. Los casos también se reportan para los animales de compañía.

Las cepas *E. coli* comensal que llevan potencialmente factores de virulencia implicados en el desarrollo de patologías humanas también colonizan el tracto intestinal de los animales. (Bélanger 2011).

## 2.5. Cepas *E. coli* patogénica aviar

Las cepas *E. coli* patogénica aviar con denominación específica APEC (*Avian Pathogenic Escherichia coli*), están englobadas dentro del patotipo *E. coli* patogénica extraintestinal (ExPEC), según la clasificación realizada por Russo y Johnson; este patotipo causa infecciones extraintestinales tanto en aves de corral como en pollos, patos y otras especies avícolas (Mellata *et al.*, 2003). El proceso infectivo más común por este patotipo, es la colibacilosis aviar, una enfermedad muy importante en la avicultura ya que supone un serio problema en relación con la salud animal, por ser una de las principales causas de enfermedad, mortalidad y pérdidas económicas en las granjas avícolas (Ewers *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2004; Vandekerchove *et al.*, 2004a). Este hecho se debe a la frecuencia con la que se presenta y a la disminución de índices productivos y de bienestar animal. (Dho-Moulin *et al.*, 1993; Gyles *et al.*, 1993; Gross *et al.*, 1994; Barnes *et al.*, 2003; Vandekerchove *et al.*, 2004c; Monroy *et al.*, 2005). Además por los elevados costes de los tratamientos (Blanco *et al.*, 1991, 1993, 1996; La Ragione *et al.*, 2002). Se presentan sobre todo en los meses de invierno y se han relacionado con la ventilación inadecuada de las granjas, malas condiciones de manejo e higiene y con factores de stress biológico. El nivel de contaminación es directamente proporcional con el nivel de infección intestinal, excreción fecal e higiene. (Dozois *et al.*, 2000; Mellata *et al.*, 2003).

## 2.6. *E. coli* como agente zoonótico: importancia de los animales como reservorio de cepas patógenas

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define como zoonosis a las enfermedades e infecciones que se transmiten de un modo natural entre personas y animales vertebrados. La verdadera importancia de *E. coli* como agente zoonótico, en el caso de la colibacilosis, reside en determinados serotipos de *E. coli*, responsables de toxiinfecciones alimentarias en el ser humano (Barnes *et al.*, 2003). Se trata, de una de la zoonosis alimentaria más frecuente e importante en el hombre debido a la gravedad

de los cuadros clínicos y al número de afectados, pudiendo suponer un grave riesgo para la salud pública. La transmisión en el caso de humano a humano es a través de alimentos, las cepas de *E. coli* de humanos se introducirían durante el proceso de preparación de la carne por los manipuladores de alimentos. En el caso de una fuente animal, los *E. coli* se derivan a partir del contenido cecal del propio animal, y de la contaminación que se producen durante el proceso de sacrificio.

Estudios como el de Ewers *et al.*, 2009, concluyeron, que ciertas cepas en ausencia de un brote, y particularmente cepas fecales provenientes del intestino de las aves de corral clínicamente sanas, tienen un potencial zoonótico, ya sea porque se transfieren directamente de las aves a los seres humanos o servir como una reserva genética de las cepas patógenas extraintestinales. Recientemente, se ha sugerido que las *Escherichia coli* que causan infección del tracto urinario (ITU) pueden provenir de la carne y los animales. Vincent *et al.*, 2010, muestra que algunos cepas *E. coli* aisladas en carne de pollo al por menor y otras fuentes de alimentos están estrechamente relacionadas con *E. coli* que causa las infecciones urinarias (ITU) en humanos, en la misma línea Jakobsen *et al.*, 2012, mostró una relación clonal entre cepas *E. coli* aisladas en de la carne y las los seres humanos, proporcionando evidencia sólida de que la ITU es zoonosis.

Hay estudios que indican que los aislados **APEC** podrían resultar patógenos para los mamíferos (Jonson *et al.*, 2006; Skyberg *et al.*, 2006) y referencias en las que cepas humanas y aviares presentan similitudes o comparten serotipos y factores de virulencia (Siek *et al.*, 2005b; Dho-Moulin *et al.*, 2006), sugiriendo que los APEC podrían actuar como reservorio de factores de virulencia para los seres humanos. (Schroeder *et al.*, 2003; Cortés *et al.*, 2010).

Los animales para el consumo pueden estar colonizados por *E. coli* productor de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido BLEE y se han considerado como posibles fuentes de cepas de *E. coli* multirresistentes causantes de infecciones en la comunidad, ya que, pueden adquirir, mantener y transmitir genes de resistencia procedentes de otros

organismos en el medio ambiente. Estas cepas se han detectado cada vez más en los alimentos de origen animal en diferentes países desde 2002 y han ganado considerable atención en todo el mundo (Junying *et al.*, 2012). Existen pocos estudios que describen una clara evidencia de la transmisión directa de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE) aisladas de animales productores de alimentos o alimentos para los seres humanos. Aunque existen datos sobre clones comunes *E. coli* BLEE en los seres humanos y animales para el consumo humano, que proporcionan evidencia indirecta sobre esta transmisión. Hallazgos recientes indican que es más probable que la transmisión de los genes de *E. coli* BLEE, plásmidos y clones de aves de corral a los seres humanos (Hammerum & Heuer 2009) puede ocurrir a través de la cadena alimentaria. Además, la evidencia de propagación de organismos portadores de BLEE a través del contacto directo con animales o indirectamente a través del medio ambiente es limitada. Sin embargo, las personas que trabajan con las aves de corral tienen un riesgo mayor para el transporte intestinal de bacterias.

## II.3. Antibióticos

---

### 3.1. Generalidades

Los antimicrobianos son sustancias que actúan inhibiendo la replicación de los microorganismos, por lo que se utilizan para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Estos antimicrobianos se clasifican en antibacterianos, antifúngicos, antivíricos, y antiparasitarios según el grupo de organismos sobre los que actúan. El término <<antibiótico>> se utiliza para denominar a aquellos antimicrobianos que son producidos de manera natural por algunos microorganismos, esencialmente por bacterias y hongos. Algunos antimicrobianos se obtienen a partir de antibióticos que son modificados por métodos químicos para obtener derivados con mejores propiedades, a estos productos se les conoce como <<semisintéticos>>. El resto de antimicrobianos desde las sulfamidas hasta los últimos antivíricos se obtienen por síntesis química y se denominan <<quimioterápicos>>.

Es un poco difícil definir cuándo comienza la historia de los antibióticos. Sin embargo, podemos citar que en los primeros años del siglo XX, cuando Paul Ehrlich anunció la eficacia del salvarsán para el tratamiento de la sífilis, muchos pensaron que la lucha contra las enfermedades infecciosas había sido ganada.

Es interesante mencionar, como relata Lago Galdston (1943) que Calvin Coolidge, hijo del trigésimo presidente de los Estados Unidos, murió el 7 de julio de 1924. La causa de su muerte fue una septicemia. Una semana antes el joven se había hecho una herida en el dedo de un pie. Parecía poco importante. Sin embargo, fue la puerta de entrada de su muerte, ya que, el martes se lesionó, el miércoles a la noche se quejó de fuertes dolores en la ingle, pensándose en apendicitis. Se llamaron a especialistas que llegaron rápidamente al verdadero diagnóstico el día jueves: septicemia. Se luchó con todo y lo mejor para salvarlo, el sábado ingresó al hospital y fue operado de urgencia, todo fue en vano, el domingo empeoró y el lunes, murió. La muerte había triunfado, no había

herramientas para la lucha. Doce años después (1936), los diarios atraían al lector con una noticia: Franklin Delano Roosevelt, hijo de otro presidente, estaba muy enfermo, infectado. Pero había más esperanzas, dado que se disponía de un medicamento capaz de matar microorganismos dentro de la corriente sanguínea. El joven se salvó. Así el público conoció el Prontosyl, la primera sulfamida. En 1935 Domagk había presentado su primera monografía sobre eficacia del Prontosyl.

En el Hospital St. Mary de Londres, Alexander Fleming en el curso de su investigación, una observación fortuita, analizada con espíritu crítico y enorme base científica, produjo el inicio de un proceso que culminó con la obtención de la **penicilina**. Mientras él estudiaba el hongo, sus productos de secreción, sus estructuras químicas, la existencia del Atoxyl, Salvarsán y Prontosyl, entre otras sustancias, hacía pensar que todo estaba resuelto. Nadie prestaba atención al nuevo descubrimiento. Pasaron diez largos años, las sulfamidas no solamente habían demostrado su eficacia, sino que se conocía como actuaban, cosa que no ocurría con la penicilina. En el año 1939 se produce un nuevo descubrimiento, René Dubos de la Fundación Rockefeller, investigando los microorganismos del suelo, descubre la tirotricina. El descubrimiento de la tirotricina, un antibiótico, llevó la atención nuevamente hacia la penicilina, dado que la tirotricina era natural, obtenida por biosíntesis, de mecanismo de acción desconocido y poderosamente activa, aunque tóxica. Howard Florey, australiano que trabajaba en Oxford, retoma el trabajo de desarrollo de la penicilina. Demostrar nuevamente la eficacia y ahora la inocuidad de la penicilina fue la primera tarea, que fue muy compleja, especialmente por las pequeñas cantidades de droga de que se disponía y la poca pureza en que se encontraba. Esto ocurría en los primeros años de la década del 40. La revolución de los antibióticos había comenzado. En los años siguientes, comenzaron a descubrirse nuevas drogas. Se transcriben algunos de los hallazgos más trascendentes: En la década del 40 estreptomycin, cloranfenicol y clortetraciclina. En la década del 50 eritromicina y vancomicina. En la del 60, gentamicina, ampicilina, cefalotina y amikacina. En la del 70, cefalexina, carbenicilina, cefoxitina y cefaclor. En la del 80, cefotaxima, moxalactam, combinación ácido clavulánico-amoxicilina, combinación imipenem-cilastatina, aztreonam. En los 90 aparecen las fluoroquinolonas, nuevos macrólidos, y nuevas cefalosporinas y agentes

antivirales más efectivos. A partir del 2000 registramos la aparición de quinolonas de espectro ampliado.

### 3.2 Clasificación de los diferentes Antibióticos

En la Tabla 5, se resume los grupos farmacológicos el mecanismo de acción y los principales antibacterianos que pertenecen a cada grupo.

Tabla 5.- Principales Antibacterianos

Mecanismo Acción	Grupo Farmacológico	Antibacterianos
<b>Pared bacteriana</b>	Betalactámicos	Penicilinas Cefalosporinas Monobactámicos Carbapenémicos
	Glucopéptidos	Vancomicina
	Fosfomicina	
	Lipopéptidos	Daptomicina
<b>Membrana citoplasmática</b>	Polimixinas	
<b>Ribosomas</b>	Macrólidos	Eritromicina Lincomicinas
	Aminoglucósidos	Gentamicina Tobramicina Amikacina
	Tetraciclina	Tetraciclinas Doxiciclina
	Gliciliclinas	Tigeciclina
	Anfenicoles	Cloranfenicol
	Oxazolidinonas	Linezolid
<b>Núcleo</b>	Rifamicinas	Rifampicina
	Quinolonas	Ac. Nalidixico Ciprofloxacina Levofloxacina
	Sulfamidas	
	Diaminopirimidinas	Trimetropin
	Nitrofuranos	Nitrofurantoina
	Nitroimidazólicos	Metronidazol

## II.4.

### Antibióticos $\beta$ -lactámicos

---

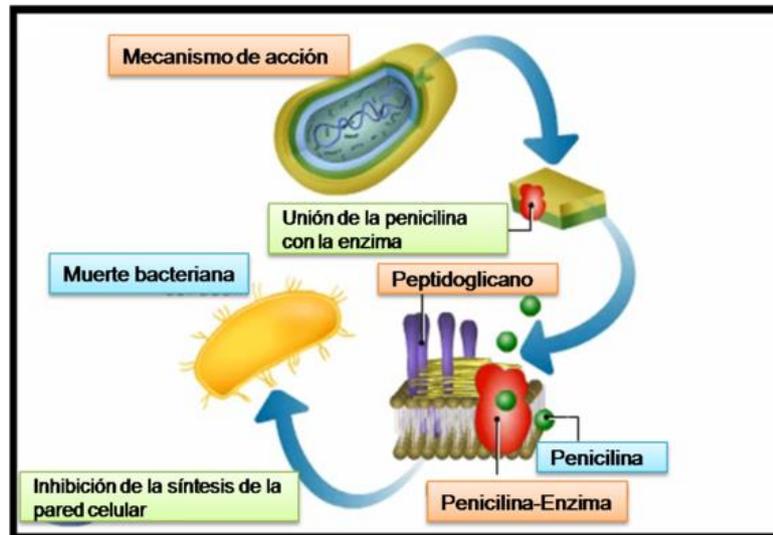
#### 4.1. Generalidades

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. En 1928 Fleming observó el efecto inhibitor del *Penicillium*, un hongo filamentoso, sobre el crecimiento de bacterias en una placa de cultivo, pero fue en la década de los 40 cuando se consigue la producción industrial de la penicilina gracias a los estudios de Florey y Chain (Joklik 1996). Se trata de antibióticos de acción bactericida lenta, con actividad dependiente del tiempo, que en general tienen buena distribución y escasa toxicidad. Estos antibióticos presentan como estructura básica el anillo  $\beta$ -lactámico, formado por la condensación de alanina y  $\beta$ -dimetilcisteína.

#### 4.2. Mecanismo de acción.

La similitud estereoquímica del anillo  $\beta$ -lactámico con el dipéptido d-alanina-d-alanina (Spratt 1963) le permite interactuar con diversas proteínas enzimáticas con actividad de transpeptidasa y carboxipeptidasas situadas en la superficie de la membrana plasmática bacteriana, moléculas encargadas de modelar la configuración definitiva de la capa de peptidoglucano, además de guiar su reorganización durante la división de las bacterias. A estas proteínas de membrana las conocemos genéricamente como proteínas fijadoras de penicilinas (penicilin binding proteins o PBPs) (Tipper & Strominger 1965). La actividad antibacteriana de los  $\beta$ -lactámicos está relacionada con la capacidad para interferir de forma competitiva, en la actividad de las PBPs (Figura 9). (Los  $\beta$ -lactámicos actúan también activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano. (Marín & Gudiol 2003). Tienen acción bactericida. Para que actúen los betalactámicos es necesario que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que es cuando se sintetiza la pared celular.

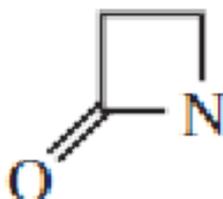
Figura 9.- Estructura del peptidoglucano y sitio de acción del  $\beta$ -lactámico. Actúan impidiendo la síntesis de la pared bacteriana, al unirse a las proteínas ligadoras de penicilinas (PBP), cuya función es catalizar una serie de reacciones de transpeptidación y carboxipeptidación necesarias para la síntesis del peptidoglucano de la pared bacteriana, inhibiendo la síntesis del peptidoglucano, que es el componente que confiere estabilidad y rigidez a la bacteria, protegiéndola de la rotura osmótica.



#### 4.3 Clasificación y estructura química. Espectro de acción.

Para que el  $\beta$ -lactámico sea activo, es preciso que esté unido a otros radicales (habitualmente otros anillos). La asociación de diferentes tipos de cadenas lineales, junto con las características propias de este esqueleto básico (Figura 10), formado por los 2 anillos (llamado núcleo), modifica las propiedades del compuesto resultante y da lugar a los diferentes grupos de antibióticos  $\beta$ -lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos e inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas. Dentro de cada grupo, pequeñas alteraciones en la estructura química son capaces de modificar las características del antibiótico, como el espectro, la afinidad por determinados receptores o la resistencia a las  $\beta$ -lactamasas (Tipper & Strominger 1965).

Figura 10.- Anillo betalactámico o  $\beta$ -lactámico, también llamado penam es una estructura lactámica con un anillo heterocíclico que consiste en tres átomos de carbono y un átomo de nitrógeno. *Fuente* Antibióticos\_betalactámicos.png



En la Tabla 6, se resume la clasificación de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos dependiendo de su estructura y destacando sus principales representantes.

Tabla 6.- Principales antibióticos  $\beta$ -lactámicos

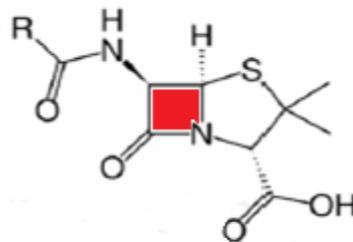
Clase	Grupo	$\beta$ -lactámico
<b>Penicilinas</b>	Penicilinas naturales	Penicilinas G (Bencilpenicilina), Penicilinas V
	Aminopenicilinas	Ampicilina, Amoxicilina
	Ureidopenicilinas	Azlocilina, Mezlocilina, Piperacilina
	Carboxipenicilinas	Ticarcilina, Carbenicilina
	Penicilinas resistentes a la penicilinasas	Meticilina, Nafcilina Isoxazolpenicilinas (Cloxacilina, Oxacilina, Dicloxacilina)
<b>Cefalosporinas</b>	Cefalosporinas 1G	Cefazolina, Cefalotina, Cefradina, Cefalexina, Cefadroxilo
	Cefalosporinas 2G	Cefamandol, Cefuroxima, Cefaclor,
	Cefalosporinas 3G	Cefixima, Cefpodoxima, Ceftibuten, Cefdinir, Cefotaxima, Ceftizoxima, Ceftazidima, Cefoperazona
	Cefalosporinas 4G	Cefepime, Cefpirome
<b>Cefamicinas</b> <b>Monobactámicos</b> <b>Carbapenémicos</b>	Cefalosporinas 2G	Cefoxitina
		Aztreonam Imipenem, Meropenem, Doripenem Ertapenem
<b>Inhibidores de la <math>\beta</math>-lactamasas</b>	Ácido Clavulánico	Amocililina- ácido Clavulánico
	Sulbactam	Ampicilina-Sulbactam
	Tazobactam	Piperacilina-Tazobactam

La penicilina continúa siendo el tratamiento de elección en un buen número de infecciones; las cefalosporinas tienen un gran abanico de indicaciones; los carbapenémicos se usan en infecciones nosocomiales y en infecciones causadas por bacterias multirresistentes, y los inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas permiten recuperar el espectro de actividad de las penicilinas a las que acompaña.

**a. Penicilinas,** son un grupo de antibióticos que contienen un anillo  $\beta$ -lactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar al doble anillo característico (Figura 11). Además tienen una cadena lateral, que varía de unas penicilinas a otras en la posición 6 del anillo  $\beta$ -lactámico y que es el que define sus propiedades.

Figura 11.- Núcleo de las penicilinas (en rojo se observa el anillo  $\beta$ -lactámico)

Fuente Antibióticos\_betalactámicos.png



Según el **espectro de acción** las penicilinas se pueden dividir en cuatro subgrupos:

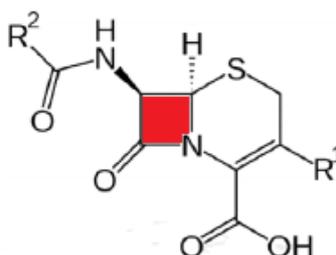
1. Las penicilinas de primera generación presentan actividad frente a bacterias grampositivas no productoras de  $\beta$ -lactamasas, bacterias anaerobias y algunos cocos gramnegativos (como el meningococo)
2. Las penicilinas semisintéticas resistentes a penicilasas son el tratamiento de elección para las infecciones debidas a bacterias del género *Staphylococcus*.

3. El espectro de acción de las aminopenicilinas es más amplio que el de las penicilinas de primera generación, actuando además frente a cocos gramnegativos, enterobacterias no productoras de  $\beta$ -lactamasas y enterococos.
4. Por último, las ureidopenicilinas y las carboxipenicilinas presentan buena actividad frente a bacilos gramnegativos aerobios incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*.

**b. Cefalosporinas,** son fármacos estructuralmente similares a las penicilinas, cuya estructura básica (Figura 12), está constituida por el núcleo cefem, que consiste en la fusión de un anillo dihidrotiacínico y un anillo  $\beta$ -lactámico. La introducción de modificaciones en las cadenas laterales origina las diversas cefalosporinas.

Figura 12.- Núcleo de las cefalosporinas (en rojo se observa el anillo  $\beta$ -lactámico)

Fuente Antibióticos\_betalactámicos.png



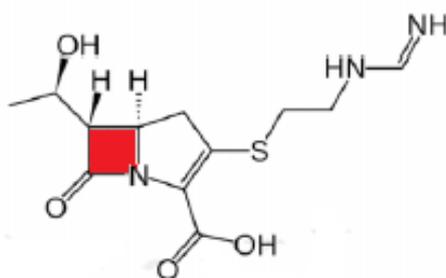
Según el **espectro de acción** se pueden dividir según su orden cronológico de aparición en cuatro generaciones:

1. Las de primera generación 1G, son las más activas frente a *Staphylococcus* no productores de  $\beta$ -lactamasas, como por ejemplo: cefalotina, cefazolina, cefaclor.
2. Las de segunda generación 2G, amplían su espectro frente a bacterias gramnegativas de origen comunitario, como por ejemplo la cefuroxima, cefamandol y junto a ellas las cefamicinas como cefoxitina y cefminox más activas frente a los *Bacteroides* del grupo fragilis.

3. Las de tercera generación 3G, son más activas frente a bacterias gramnegativas de adquisición nosocomial, como por ejemplo: cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona.
4. Las de cuarta generación 4G, presentan buena actividad frente a bacterias grampositivas, gramnegativas y *Pseudomonas*, como por ejemplo: cefepima.

**c. Carbapenémicos**, su estructura básica consiste en la unión de un anillo  $\beta$ -lactámico con un anillo pirrolidínico compartiendo un nitrógeno (Figura 13). Estas modificaciones y las cadenas laterales, así como la posición de estas condicionan la mayor afinidad por las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP) diana, un incremento de la potencia del espectro bacteriano y de la resistencia a las  $\beta$ -lactamasas siendo los  $\beta$ -lactámicos de más amplio espectro y actividad. Los carbapenémicos son muy estables frente a  $\beta$ -lactamasas de manera que dentro de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son lo que presentan el espectro más amplio.

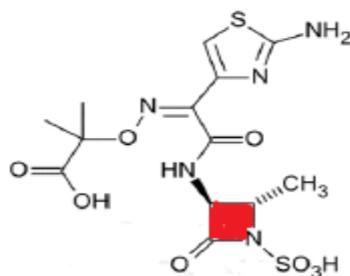
Figura 13.- Estructura del Imipenem  
Fuente Antibióticos\_betalactámicos.png



Los representantes de este grupo son imipenem, meropenem y ertapenem siendo activos frente a bacterias grampositivas, gramnegativas y anaerobias. Imipenem es más activo frente a bacterias grampositivas, mientras que ertapenem y meropenem presentan mayor actividad frente a bacterias gramnegativas aerobias. Cabe destacar la falta de actividad de ertapenem frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

**d. Monobactámicos**, contienen solo el anillo  $\beta$ -lactámico (Figura 14). Son derivados del ácido 3 aminomonobactámico (3-AMA). Tienen una estructura  $\beta$ -lactámica sencilla con una estructura monocíclica en la que el anillo  $\beta$ -lactámico no está fusionado a otro secundario.

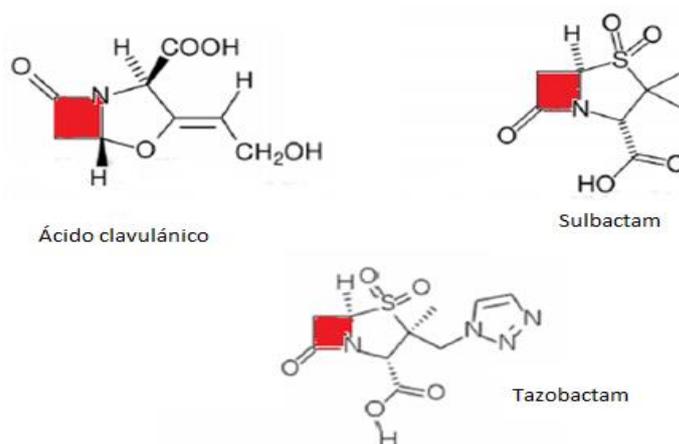
Figura 14.- Estructura del Aztreonam  
Fuente Antibióticos\_betalactámicos.png



Aztreonam es el único representante de este grupo, siendo activo frente a bacterias gramnegativas aerobias, incluyendo a *Pseudomonas aeruginosa* pero carece de actividad frente a bacterias grampositivas ni anaerobios.

**e. Inhibidores de  $\beta$ -lactamasas**, son moléculas que presentan escasa actividad intrínseca y se utilizan en combinación con penicilinas (amoxicilina- ac. clavulánico, ampicilina-sulbactam, ticarcilina-ac.clavulánico y piperacilina-tazobactam) para restaurar la actividad inicial del  $\beta$ -lactámico en organismos que se han hecho resistentes por producción de  $\beta$ -lactamasas (*Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae*, *bacteroides* spp) y amplían el espectro a bacterias que no eran sensibles intrínsecamente por producción natural de estas enzimas (*K. pneumoniae*).

Figura 15. - Estructura de los inhibidores de betalactamasas  
Fuente Antibióticos\_betalactámicos.png



Dentro de los inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas con una estructura  $\beta$ -lactámica se encuentran el sulbactam, el ácido clavulánico y el tazobactam. Figura 15.

- ✓ El sulbactam es una sulfona semisintética del ácido penicilánico.
- ✓ El tazobactam posee un grupo triazol en posición 3.
- ✓ El ácido clavulánico tiene un núcleo similar al ácido penicilánico de las penicilinas pero se sustituye el átomo de azufre por uno de oxígeno aumenta la afinidad por las  $\beta$ -lactamas y carece de la cadena lateral acilamino en posición 6.
- ✓ Estos inhibidores se fijan a las  $\beta$ -lactamasas dejándose hidrolizar por ellas y permite así que esas no interfieran en la acción de los  $\beta$ -lactámicos con los que se combinan.

## II.5.

### Mecanismos de Resistencia bacteriana

---

Entendemos por resistencia bacteriana la condición microbiológica caracterizada por la capacidad natural o adquirida por parte de una cepa bacteriana de permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un antibiótico (Jacoby *et al.* 1995). Las bacterias a lo largo del tiempo han producido una amplia variedad de mecanismos de resistencia, con el fin de contrarrestar el efecto de los antibióticos. Aunque el fenómeno de la resistencia antimicrobiana, es común en casi todas las especies de bacterias, solo algunas cuantas lo han desarrollado en una magnitud tal que se ha convertido en un verdadero problema de salud pública, oscureciendo el pronóstico clínico en algunos casos e incrementando los costos en salud.

#### 5.1. Genética molecular de la resistencia antimicrobiana

Para que tenga lugar la evolución microbiana es esencial una variabilidad genética. La menor sensibilidad a un antimicrobiano de un microorganismo depende de su capacidad para adaptarse a las condiciones cambiantes del medio ambiente (Rice *et al.*, 2001). Los fármacos antimicrobianos ejercen presiones selectivas potentes sobre las poblaciones bacterianas, favoreciendo a los microorganismos que son capaces de resistir (Lupski *et al.*, 1987; Rice *et al.*, 2001). La variabilidad genética acontece a través de diversos mecanismos. Las mutaciones puntuales pueden producirse en un par de bases de nucleótidos, y se denominan *cambios microevolutivo*. Estas mutaciones pueden alterar la especificidad del sustrato enzimático o el lugar diana de un fármaco antimicrobiano, interfiriendo con su actividad. Un segundo nivel de variabilidad genómica en las bacterias se conoce como *cambio macroevolutivo* y da lugar a reordenamientos de extensos segmentos de ADN como acontecimiento

individual. Dichos reordenamientos pueden incluir inversiones, duplicaciones, inserciones, deleciones o transposiciones de secuencias extensas de ADN desde un lugar de un cromosoma o plásmido bacteriano a otro. Estos reordenamientos a gran escala de segmentos enteros del genoma bacteriano con frecuencia son generados por elementos genéticos especializados llamados integrones, transposones o secuencias de inserción, que tienen la capacidad de insertar, reordenar y moverse independientemente del resto del genoma bacteriano. (Lupski *et al.*, 1987). Un tercer nivel de variabilidad genética en las bacterias se crea por la adquisición del ADN extraño portado por los plásmidos, bacteriófagos, secuencias de ADN desprovistas de cubierta (ADN desnudo) o elementos genéticos transmitidos de otras bacterias (es decir transmisión horizontal).

La herencia de ADN extraño contribuye aún más a la variabilidad genética de un microorganismo y su capacidad para responder a las presiones de selección impuestas por los antimicrobianos (Medeiros *et al.*, 1997). Una vez el gen de resistencia antimicrobiana evoluciona puede propagarse entre bacterias por transformación, transducción, conjugación o transposición. Los clones favorecidos de las bacterias pueden proliferar en la microbiota de pacientes tratados con antibióticos. Se tienen pruebas de que los genes de resistencia antimicrobiana ya estaban presentes antes de que estuviera disponible el tratamiento antibiótico y es probable que se originaran de bacterias productoras de antibióticos (Medeiros *et al.*, 1997; Gardner *et al.*, 1969).

## 5.2. Elementos de transferencia horizontal en *Enterobacteriaceae*

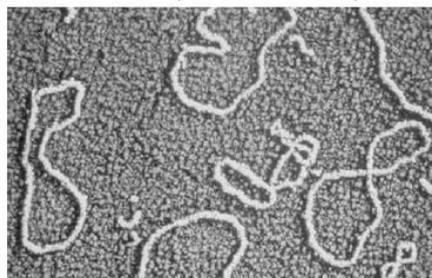
La transferencia horizontal parece tener un papel crucial en la adaptación bacteriana a nichos ecológicos específicos y en la diseminación y la persistencia de la resistencia a antibióticos entre miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Bennett 2004; Frost *et al.*, 2005). La estructura modular de los elementos de transferencia horizontal favorece el intercambio entre distintos elementos genéticos, dotando de una gran plasticidad a las poblaciones bacterianas (Osborn *et al.*, 2002; Toussaint *et al.*, 2002). Recientemente se ha sugerido que la transferencia horizontal está más favorecida por la proximidad entre microorganismos que comparten características genéticas como el

tamaño del genoma o su contenido en G+C que por su proximidad filogenética (Jain *et al.*, 2003). Estos grupos bacterianos que intercambian material genético de forma preferencial son denominados “comunidades de intercambio genético” (“exchange communities”). A continuación, se analizan los principales elementos genéticos móviles asociados a la diseminación de la resistencia a antibióticos en *Enterobacteriaceae*.

### 5.2.1. Plásmidos

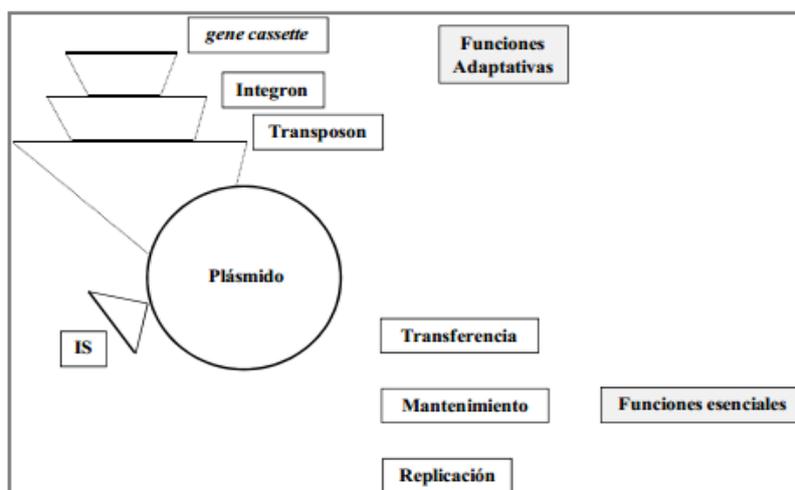
Son elementos extracromosómicos que ya estaban presentes en las bacterias (Gardner *et al.*, 1969; Barlow *et al.*, 2008) antes de la introducción de los antimicrobianos en el siglo XX. El tratamiento antimicrobiano creó presiones de selección que favorecieron la propagación de los genes de resistencia a través de los elementos genéticos móviles (Lupski *et al.*, 1987; Medeiros *et al.*, 1997; Barlow *et al.*, 2008). Los plásmidos son elementos genéticos que se replican de forma autónoma y están formados por moléculas circulares de ADN bicatenario, cerradas de modo covalente y cuya longitud varía desde menos de 10 pares de kilobases hasta más de 400 kilobases. Son habituales en las bacterias (Barlow *et al.*, 2008). Los plásmidos (Figura 16), están especialmente adaptados para servir como elementos de intercambio genético y propagación de genes de resistencia (Rice *et al.*, 2001; Medeiros *et al.*, 1997). Además de la resistencia antimicrobiana, los plásmidos pueden determinar una amplia variedad de funciones incluida la virulencia y la capacidad metabólica. Todos los plásmidos poseen un sitio de replicación del ADN polimerasa para unirse y replicar el ADN plásmido.

Figura 16.- Fotografía al microscopio electrónico de un pequeño plásmido bacteriano  
Fuente (Bennett 2008)



Los plásmidos se componen de una región constante que contiene los genes responsables de funciones esenciales como la replicación, el mantenimiento y la transferencia, y una región variable donde se localizan los genes responsables de funciones adaptativas (resistencia a antibióticos, factores de virulencia, o producción de bacteriocinas) (Osborn *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2004; Thomas 2004). (Figura 17)

Figura 17.- La estructura de los plásmidos. (Adaptada Osborn *et al.*, 2000)



La clasificación de los plásmidos se ha realizado en base a diferentes criterios, como el número de copias, el rango de hospedador, el grupo de incompatibilidad, y su capacidad de transferencia entre células. Esta última característica permite diferenciar estos elementos en plásmidos conjugativos y plásmidos movilizables (Taylor *et al.*, 2004).

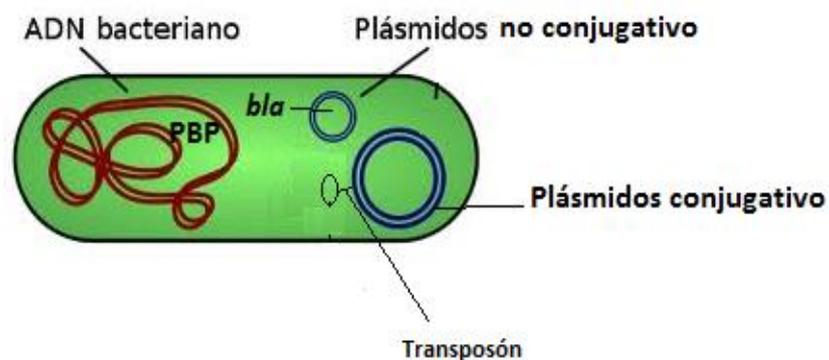
### 5.2.2 Elementos Genéticos Transponibles

Los Transposones pueden translocarse como una unidad desde un área del cromosoma bacteriano a otra o entre el cromosoma y el plásmido o el ADN del bacteriófago. Los elementos genéticos transponibles poseen un sistema especializado de recombinación que es independiente del sistema de recombinación generalizado que clásicamente permite la recombinación de

secuencias de ADN en gran parte homologas a través de acontecimientos de entrecruzamiento (el sistema *recA* de las bacterias). Existen dos tipos de elementos genéticos transponibles transposones (Tn) y secuencias de inserción poseen características similares. Los transposones difieren de las secuencias de inserción porque codifican genes funcionales que median una característica fenotípica reconocible, como un marcador de resistencia antimicrobiana. Los transposones y las secuencias de inserción son incapaces de autorreplicarse y deben estar presentes en un replicón, como el cromosoma, un bacteriófago o un plásmido para replicarse y mantenerse en una población bacteriana. Algunos transposones tienen la capacidad de moverse de una bacteria a otra sin permanecer fijos en un plásmido o bacteriófago. Se hace referencia a estos elementos como transposones *conjugativos*.

La transposición suele dar lugar a la replicación localizada del elemento transponible a partir de la secuencia de ADN del donante original y la inserción de una copia del elemento transponible en la secuencia receptora de ADN (transposición replicativa) (Rice *et al.*, 2001; Lupski *et al.*, 1987). Similar a la mutación puntual, la transposición es un proceso continuado en la población bacteriana. Los transposones también son esenciales en la evolución de los plásmidos de resistencia que contienen múltiples determinantes de resistencia antimicrobiana.

Figura 18.- Elementos Genéticos extracromosomal.



Se observa en la representación (Figura 18), un microorganismo con tres genes de resistencia antimicrobiana, el primero en el cromosoma (denominado *PBP*, una proteína de unión a penicilina de baja afinidad) el segundo (un gen de  $\beta$ -lactamasas *bla*) en un plásmido pequeño no conjugable y el tercero (TET M, un determinante de resistencia a la tetraciclina) en un transposón que se encuentra en un plásmido autoconjugables de gran tamaño.

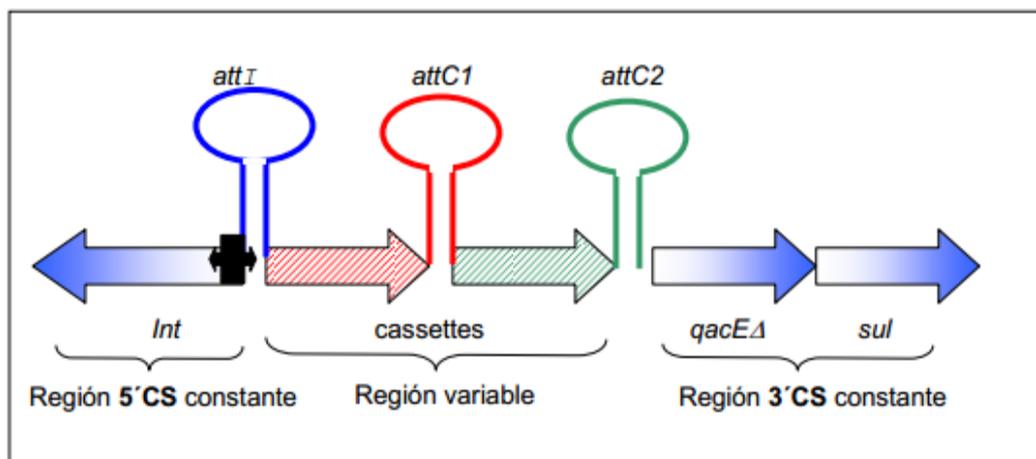
El intercambio genético de genes de resistencia antimicrobiana acontece entre bacterias de especies y géneros muy diferentes (Brisson *et al.*, 1988). Debido a las presiones muy variables de selección ambiental creadas por los antimicrobianos y la plasticidad de los genomas bacterianos, parece inevitable la evolución continuada de especies multirresistentes (Cohen 1992; Hawkey 1998).

### 5.2.3. Elementos de Integración del ADN

El análisis genético de las secuencias de ADN adyacentes a los genes de resistencia antimicrobiana reveló que las unidades de integración exclusiva suelen existir cerca de los lugares promotores (Recchia *et al.*, 1997). Estos elementos de integración, llamados *integrones* (Recchia *et al.*, 1997), facilitan la transferencia e integración lateral de genes de resistencia antimicrobiana a partir de cassettes génicas móviles. Los integrones son estructuras genéticas que han despertado gran interés (Hall & Collis 1997), debido a que algunos de ellos vehiculizan genes de resistencia a los antimicrobianos.

Un integrón se puede definir como un elemento genético dinámico, en el que por un mecanismo de recombinación sitio-específica acumula una combinación de genes estructurales organizados como un operón. Los genes estructurales presentes en los integrones conocidos son mayoritariamente, pero no exclusivamente, genes de resistencia a antibióticos. Para la actividad de los integrones se requiere un gen que codifica una recombinasa sitio-específica conocida como **integrasa**, cuya función es catalizar la recombinación entre dos secuencias cortas de ADN que pueden ser de dos clases *attI* y *attC*.

Figura 19. - Estructura básica de un integrón. La región variable consta de uno o varios cassettes con los distintos genes de resistencia. La caja negra con doble flecha corresponde a la zona donde se sitúan los dos promotores divergentes. En la parte superior aparece la estructura y ubicación de los correspondientes sitios *attC*.



Estructuralmente se suele hablar de tres regiones en un integrón (Figura 19): Una región constante 5' que contiene básicamente el gen de la integrasa que se transcribe de derecha a izquierda. En el extremo 5' del gen de la integrasa se encuentra una región con dos promotores divergentes que controlan respectivamente la transcripción del gen de la integrasa y la de los genes estructurales situados a la derecha. A continuación nos encontramos una región central variable en la que se localizan los genes estructurales del integrón (casi siempre genes de resistencia a antibióticos) en número variable que suele oscilar de uno a cuatro, aunque conocemos integrones descargados (*In0*) que no contienen ningún gen en la región central.

Las regiones constante 5' y central variable están separadas por la secuencia *attI*, uno de los sitios de reconocimiento de la integrasa. Los genes constitutivos en la región central están separados unos de otros por secuencias *attC*. Una característica de esta región central es su compacidad genética. Los cassettes de resistencia, constan de un gen de resistencia y un sitio *attC* y son el elemento móvil del sistema (Hall & Stokes 1993).

Las regiones no codificantes suelen ser siempre muy cortas, generalmente menos de 10 pb. De este modo es posible la organización de todos los genes en una sola

unidad transcripcional controlada por el promotor presente en la región constante 5', aunque las secuencias attC intergénicas pueden actuar como terminadores parciales de la transcripción. Dependiendo de los genes presentes en la región central se ha propuesto una nomenclatura para los integrones In0, In1, In2... No obstante, la enorme diversidad que se está encontrando en la región central de los integrones hace este sistema poco práctico, y resulta más sencillo hacer una descripción de los integrones por los genes presentes en la región variable. En la actualidad se habla de cuatro tipos de integrones que se distinguen por la integrasa que codifican. A continuación de la región variable se encuentra una región constante 3'CS en la que se encuentra un locus de resistencia a bromuro de etidio (*qacEΔ*), el gen que codifica resistencia a sulfamidas (*sul1*) y otros marcos abiertos de lectura que contienen genes cuya función no es del todo conocida.

Se habla, en general, de "integrones móviles" para referirse a aquellos asociados a secuencias de inserción, transposones y/o plásmidos conjugativos, los que en su mayoría median mecanismos de resistencia, y de "superintegrones" (SI), de localización cromosómica y con grandes arreglos de genes en cassettes. Los integrones móviles de clase 1 son los más abundantes en aislamientos clínicos y suelen estar asociados a transposones del subgrupo Tn21, seguidos por los de clase 2, derivados principalmente de Tn7. Estos elementos no son móviles por sí mismos, pero su asociación con elementos que sí lo son facilita su transferencia horizontal, lo que explica su amplia difusión entre las bacterias.

El papel principal de los integrones es proporcionar un lugar de inserción conveniente a los genes de resistencia antimicrobiana de fuentes de ADN extraño.

### 5.3. Propagación de la Resistencia

Una vez que la bacteria es resistente al antibiótico es capaz de transmitir su resistencia de forma vertical a su descendencia o de forma horizontal a otras bacterias que pueden ser de distinta especie e incluso género mediante la

transferencia del material genético que codifica esa resistencia. Esta última es la forma más común de transmisión de resistencias. Fig. 20.

El intercambio de genes de resistencia antimicrobiana acontece entre bacterias de especies y géneros diferentes. Hay estudios que demuestran la transferencia de plásmidos entre especies in vivo, como el trabajo de Marchandin y colaboradores (1999) en, que describen la transferencia de una  $\beta$ -lactamasa plasmídica entre cuatro enterobacterias diferentes aisladas de un mismo paciente ingresado en un hospital y sometido a presión antibiótica.

### 5.3.1. Intercambio genético entre bacterias

Existen varias formas de intercambio genético entre bacterias:

- Transformación

El DNA es adquirido directamente del medio ambiente a partir de una bacteria que ha liberado su material genético al exterior y es recogido por la bacteria receptora. Una vez dentro de la bacteria el DNA podrá mantenerse como tal cuando se trate de un elemento autónomo, o bien integrarse en el genoma del huésped por recombinación.

- Transducción

Un bacteriófago interviene en el proceso transfiriendo los genes de resistencia entre bacterias compatibles. En la transducción el DNA está protegido del medio ambiente pudiendo sobrevivir largos periodos de tiempo. Es el método más restringido y específico, ya que el rango del huésped, es determinado por la interacción entre el bacteriófago y el receptor bacteriano. Clínicamente, sólo tiene importancia en la transmisión de genes de resistencia de cocos grampositivos, fundamentalmente *S. aureus*.

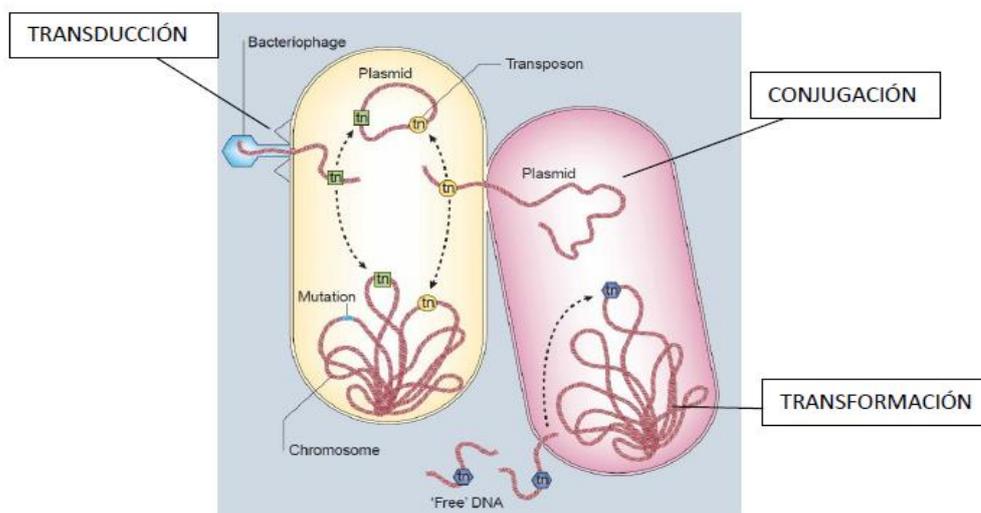
- Conjugación

La conjugación es la vía principal de diseminación de genes de resistencia entre las poblaciones bacterianas. Éste es el mecanismo de intercambio de genes más importante entre las bacterias gramnegativas. Para que se produzca es imprescindible que las bacterias estén en contacto directo entre sí y por la tanto es muy frecuente que ocurra entre bacterias que comparten nicho biológico, como ocurre con las enterobacterias en el intestino. En los microorganismos gramnegativos participa en el proceso un “pilus conjugativo” a través del cual se produce el intercambio de material genético. La conjugación está mediada por plásmidos.

- Transposición

Los transposones son secuencias de ADN especializado que poseen sus propias enzimas de recombinación (transposasas), lo que permite la transposición (<<salto>>) de un lugar a otro, con independencia de las enzimas de recombinación del huésped. Se pueden transponer a secuencias no homologas de ADN y diseminar los genes de resistencia antimicrobiana a múltiples plásmidos o localizaciones genómicas del huésped. Algunos transposones poseen la capacidad para moverse directamente de un donante a un receptor, al margen de otros fenómenos de transferencia de genes (transposones conjugables).

Figura 20.- Mecanismos y elementos genéticos implicados en la transferencia de genes de resistencia entre bacteria (adaptados de Levy S & Marshall B. 2004)



#### 5.4. Mecanismos de resistencia antimicrobiana

Cuatro son los mecanismos responsables de la resistencia bacteriana clínicamente significativa tanto a las penicilinas como a otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

1. Destrucción del antibiótico mediante  $\beta$ -lactamasas.
2. Fracaso del antibiótico para atravesar la membrana externa de los microorganismos gramnegativos para alcanzar las PBP.
3. Bombeo del fármaco a través de la membrana externa de las bacterias gramnegativas.
4. Unión de baja afinidad del antibiótico a las PBP objetivo.

##### 5.4.1. Destrucción del antibiótico mediante $\beta$ -lactamasas

###### 5.4.1.1. Generalidades

Las  $\beta$ -lactamasas o penicilin amido-beta-lactamhidrolasas han sido definidas por el Nomenclature Committee of the Internacional Unión of Biochemistry como “enzimas que hidrolizan amidas, amiditas y otras uniones C-N”.

Las  $\beta$ -lactamasas están codificadas por genes cromosómicos o por genes transferibles localizados en plásmidos y transposones. Además, con frecuencia, los genes de las  $\beta$ -lactamasas (*bla*) residen en los integrones, en general portadores de determinantes de multirresistencia.

Estas enzimas están ampliamente distribuidas en bacterias tanto grampositivas como gramnegativas, constituyendo el mecanismo más frecuente de resistencia en contra de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Ambler 1980; Collatz *et al.* 1990).

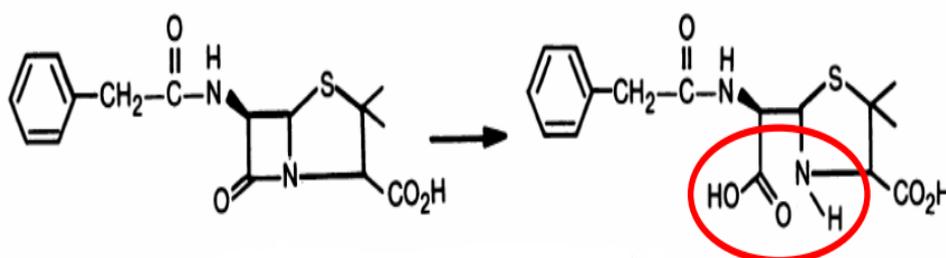
Las  $\beta$ -lactamasas son la mayor defensa de las bacterias gramnegativas frente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Son enzimas responsables de la mayor parte de los fracasos terapéuticos debido a que hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico

inactivándolo (Bush 1989). En las bacterias gramnegativas, las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas son constitutivas y su grado de producción está en relación con el número de copias del plásmido, mientras que las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas, pueden ser constitutivas o inducibles (Jacoby & Muñoz-Price 2005) (Marín & Gudiol 2003).

#### 5.4.1.2. Mecanismo de acción de las $\beta$ -lactamasas

El mecanismo de resistencia más frecuente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos es la producción de  $\beta$ -lactamasas. El mecanismo de acción se produce inicialmente por una unión reversible y no covalente entre la enzima y el anillo  $\beta$ -lactámico de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. El grupo hidroxilo libre del residuo de serina del sitio activo rompe el anillo  $\beta$ -lactámico formándose un enlace covalente. Se produce la hidrólisis del enlace acil mediante la intervención de una molécula de agua, liberándose el antibiótico inactivo y la  $\beta$ -lactamasa activa (Livermore 1998) (Figura 21).

Figura 21.- Mecanismo de acción de las  $\beta$ -lactamasas sobre los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Fuente: Clinical Microbiology Reviews



Las BLEE tienen la capacidad de hidrolizar las oximinocefalosporinas como ceftriaxona (CRO), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ) y el aztreonam (ATM), quedando sensibles frente a las cefamicinas (cefoxitin, cefotetam) y carbapenémicos (imipenem, meropenem, ertapenem). Son clasificadas de

acuerdo con dos sistemas generales: Ambler (1980) basada en la estructura molecular y la de Bush, Medeiros y Jacoby (1995) basada en similitudes funcionales (substratos). Se ha descrito diferentes familias de BLEE, como TEM y SHV y otros tipos como las cefotaximasas (CTX-M) descritas en 1989, las que se caracterizan por conferir resistencia de alto nivel a cefuroxima (CXM), cefotaxima (CTX) y cefepime (FEP). Las BLEE, constituyen un problema terapéutico y epidemiológico de gran magnitud, la presencia de estas cepas en las infecciones, conllevan a multirresistencia ya que son portadoras de otros genes que provocan resistencia cruzada a quinolonas, aminoglucósidos e incluso cotrimoxazol; de ahí la gran importancia de una adecuada y oportuna identificación.

Hoy se conocen más de 160 variantes de TEM, la mayoría de ellas BLEE, pero también aquí se incluyen las enzimas IRT (inhibitor resistant TEM) y CMT (complex mutant TEM), más de 115 para SHV y más de 80 de CTX-M (clasificadas en cinco grupos: CTX-M<sub>-1</sub>, CTX-M<sub>-2</sub>, CTX-M<sub>-8</sub>, CTX-M<sub>-9</sub> y CTX-M<sub>-25</sub>), y la cifra sigue creciendo. Además, aparecen nuevas BLEE como PER, VEB, GES, SFO, TLA, BEL, BES e IBC5. Las diferencias en las secuencias de aminoácidos de las enzimas TEM, SHV y otras enzimas (OXA, CTX-M, CMY, IMP, VIM, KPC) están actualizadas en la página web dedicada a la nomenclatura de George Jacoby y Karen Bush.

#### 5.4.1.3. Clasificación de las $\beta$ -lactamasas

Tanto la clasificación como la nomenclatura de las  $\beta$ -lactamasas constituyen un problema, debido a que cuando se introducía en la práctica clínica un nuevo antibiótico  $\beta$ -lactámico aparecía, prácticamente al tiempo, una nueva  $\beta$ -lactamasa que lo hidrolizaba, de manera que ha aumentado enormemente su número lo que requería y requiere nuevas clasificaciones y constantes actualizaciones (Bush 1989). Es por ello que hayan sido propuestos numerosos esquemas de clasificación de estas enzimas. El primero de ellos fue

clasificarlas en penicilinasas y cefalosporinasas que hidrolizan penicilinas y cefalosporinas respectivamente. Más adelante, estas enzimas han sido clasificadas de acuerdo a su perfil de sustrato, punto isoeléctrico, peso molecular, reacción con los inhibidores y otros criterios bioquímicos, así como por su origen cromosómico o plasmídico. (Heritage *et al.*, 1999) (Jaurin & Grundstrom 1981) (Medeiros *et al.*, 1985).

#### 5.4.1.3.1. Antecedentes históricos

Fue en 1940 cuando se descubrió la primera  $\beta$ -lactamasa por Abraham y Chain. El primer esquema funcional que fue aceptado fue en 1968 realizado por Sawai y colaboradores los cuales describen penicilinasas, cefalosporinasas y de amplio espectro. Mitsuhashi e Inoue añaden en 1981 el término cefuroximasa. En 1973, Richmond y Sykes realizaron una revisión meticulosa de la literatura sobre  $\beta$ -lactamasas, presentaron un esquema de clasificación para las  $\beta$ -lactamasas de bacterias gramnegativas, clasificando estas enzimas en cinco grupos basándose en el perfil de sustrato. Tres años más tarde (1976) Sykes y Matthew amplían este esquema teniendo en cuenta el punto isoeléctrico como criterio para clasificar las  $\beta$ -lactamasas.

En 1980 Ambler clasifico las  $\beta$ -lactamasas en función de su estructura molecular en cuatro clases (A, B, C, D). Asimismo indica que las  $\beta$ -lactamasas de las clases A, C y D tienen en su centro activo serina mientras la clase B son metaloenzimas. (Ambler 1980).

Finalmente, Bush en 1989, en un esfuerzo por actualizar la clasificación de las  $\beta$ -lactamasas, propone una modificación del esquema de Richmond y Sykes, intentando relacionar el sustrato y los perfiles de inhibición con la estructura molecular lo que ha constituido la base de la clasificación actual publicada en 1995 por Bush, Jacoby y Medeiros.

## 5.4.1.3.2. Clasificación molecular de Ambler (Ambler 1980)

En base a su estructura primaria han sido propuestas cuatro clases moleculares A, B, C, D. La clase A (serinpenicilinasas), clase B (metaloenzimas), clase C (serin-cefalosporinasas) y clase D (serin-oxacilinasas). La clasificación molecular reconoce tres clases de serinenzimas y una de metaloenzimas. Las  $\beta$ -lactamasas de clase A, C y D hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico a través de un residuo serina en su lugar activo, mientras que las enzimas de clase B son metalo-  $\beta$ -lactamasas que usan Zinc. (Tabla 7)

Tabla 7.- Clasificación de Ambler de las  $\beta$ -lactamasas.  
De acuerdo con la revisión de Frère y cols. (Frere, Galleni *et al.*, 2005)

Clase	Lugar activo	Tipo enzima	Ejemplos
<b>A</b>	Serina	<b>Penicilinasas</b>	PC <sub>1</sub> en <i>S. aureus</i>
		Amplio espectro	TEM <sub>-1</sub> , SHV <sub>-1</sub> en <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella p.</i> y otras bacterias gramnegativas.
		Espectro extendido (BLEE)	En enterobacterias: TEM-derivadas, SHV-derivadas, CTX-M derivadas y otras.
		<b>Carbapenemasas</b>	KPC-1, KPC-2, KPC-3 en <i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>B</b>	Metalo $\beta$ -lactamasas (Zn <sup>++</sup> )	<b>Carbapenemasas</b>	IPM, VIM, GIM, SPM, linajes SIM en <i>P. aeruginosa</i> , especies de <i>Acinetobacter</i>
<b>C</b>	Serina	<b>Cefalosporinasas</b>	Enzimas <i>AmpC</i> en enterobacterias y <i>Acinetobacter baumannii</i>
<b>D</b>	Serina	<b>Oxacilinasas</b>	Familia OXA en <i>P. aeruginosa</i>
		Amplio espectro	OXA-derivados en <i>P. aeruginosa</i>
		Espectro extendido	OXA-derivados en especies de <i>Acinetobacter</i>
		<b>Carbapenemasas</b>	OXA-derivados en especies de <i>Acinetobacter</i>

- **Clase A**

Estas enzimas se encuentran tanto en bacterias grampositivas como gramnegativas. Pueden ser de origen cromosómico o plasmídico. Estudios cristalográficos han demostrado que la estructura de la proteína es homóloga. (Ambler *et al.*, 1991). El peso molecular de estas enzimas es alrededor de 25.000 daltons.

- **Clase B**

Estas enzimas difieren de las otras  $\beta$ -lactamasas en que usan el ión zinc, para unir el residuo histidina o cisteína con el grupo carboxilo de la unión amida de la mayoría de las penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas. (Gupta 2007). La clase B, es más heterogénea, y en ella se distinguen tres grupos diferentes de metalo-  $\beta$ -lactamasas, B1, B2 y B3. B1 y B3 englobarían enzimas con amplio espectro de acción que actuarían frente a la mayoría de los  $\beta$ -lactámicos excepto monobactámicos, mientras que B2 son carbapenemasas las cuales presentan poca acción frente a penicilinas y cefalosporinas. Mientras que B1 y B3 presentan su máxima actividad cuando tienen dos átomos de Zn; B2 se inactiva cuando incorpora otro átomo de Zn. (Frere *et al.*, 2005)

- **Clase C**

A este grupo pertenece la enzima AmpC, la cual es una serin-cefalosporinasa con una estructura diferente a las serin-penicilinasas y serin-D-alanina carboxipeptidasas. Son proteínas de gran tamaño, el peso molecular de estas enzimas es alrededor de 39,000 daltons (Jaurin & Grundstrom 1981) Estas enzimas confieren resistencia a las oximinocefaloporinas, 7- $\alpha\alpha\alpha$ -metoxicefalosporinas y no son afectadas por los inhibidores. (Gupta 2007) que además de la serina contienen en el centro activo DD-transpeptidasas/carboxypeptidasas (conocida como penicilin-binding proteins PBPs).

- **Clase D**

A este grupo pertenecen las serin-oxacilinasas especialmente activas frente a oxacilina. Ouellette y colaboradores demostraron en 1987 la relación entre la  $\beta$ -lactamasa OXA-1 y otras secuencias de  $\beta$ -lactamasas (Ouellette *et al.*, 1987). El peso molecular de estas enzimas es alrededor de 30.000 daltons. (Frere *et al.*, 2005)

#### 5.4.1.3.3 Clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros (Bush, Jacoby *et al.*, 1995)

Por otra parte, el sistema de clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros divide las enzimas en varios grupos funcionales de acuerdo con el perfil de su sustrato y sensibilidad a los inhibidores de la  $\beta$ -lactamasa, como el ácido clavulánico. Esta clasificación es la más útil pues supone más ayuda para el médico o microbiólogo en su diagnóstico de laboratorio debido a que considera los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas y los sustratos de los  $\beta$ -lactámicos. En la Tabla 8 se representa un esquema de esta clasificación.

Tabla 8. - Clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medeiros de las  $\beta$ -lactamasas

Grupo	Tipo de enzima	Inhibición por clavulanato	Clase Molecular	Localización
1	Cefalosporinasa	No	C	Cromosómico como Plásmidos
2a	Penicilinasa	Sí	A	Cromosómico como Plásmidos
2b	Amplio Espectro	Sí	A	Cromosómico como Plásmidos
2be	Espectro extendido	Sí	A	Cromosómico como Plásmidos
2br	Resistente al inhibidor	Disminuido	A	Plásmidos
2c	Carbenicilinasa	Sí	A	Cromosómico como Plásmidos
2d	Cloxacilinasas	Sí	D o A	Cromosómico como Plásmidos
2e	Cefalosporinasa	Sí	A	Cromosómico como Plásmidos
2f	Carbapenemasa	Sí	A	Cromosómico
3	Carbapenemasa	No	B	Cromosómico como Plásmidos
4	Penicilinasa	No	A	Cromosómico como Plásmidos

**• Grupo 1**

Las enzimas de este grupo se correlacionan con la clase molecular C. Pertenecen a este grupo cefalosporinasas que no son inhibidas por el ácido clavulánico o sulbactam, pero son inhibidas por el aztreonam y cloxacilina. Su peso molecular suele ser superior a 30.000 daltons y su punto isoeléctrico es básico. La mayor parte de ellas son de origen cromosómico e hidrolizan fundamentalmente a cefaloridina y cefalotina.

**• Grupo 2**

Son penicilinasas, cefalosporinasas y  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro que son sensibles a la acción de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasa y se correlacionan con las clases A o D de la clasificación molecular de Ambler. En este grupo se incluyen varios subgrupos debido a la alta diversidad de sustratos encontrados.

**Grupo 2a**

Son penicilinasas que se encuentran fundamentalmente en bacterias grampositivas. Pertenecen a la clase molecular A.

**Grupo 2b**

Estas  $\beta$ -lactamasas son de amplio espectro actuando sobre penicilinas y cefalosporinas y son inhibidas por el ácido clavulánico. Pertenecen a la clase molecular A y son de origen plasmídico. Las enzimas TEM<sub>-1</sub>, TEM<sub>-2</sub> y SHV<sub>-1</sub> pertenecen a este grupo.

**Grupo 2be**

A este grupo pertenecen las  $\beta$ -lactamasas que son capaces de hidrolizar antibióticos  $\beta$ -lactámicos de espectro extendido y son fuertemente inhibidas por el ácido clavulánico como por ejemplo TEM<sub>-3</sub>, CAZ<sub>-1</sub>, SHV<sub>-2</sub>, SHV<sub>-3</sub> y  $\beta$ -lactamasa cromosómica K1 debido a su acción sobre el aztreonam. Estructuralmente derivan del grupo 2b y son de espectro extendido.

### Grupo 2br

Dentro de este grupo se encuentran las enzimas mediadas por plásmidos con acción disminuida frente a amino-, carboxy- y ureido-penicilinas. Derivan de TEM<sub>1</sub> y TEM<sub>2</sub> y son las denominadas IRT (Inhibitor- resistant TEM). Se encontraron inicialmente en *E. coli* pero en la actualidad se han informado casos en otras Enterobacterias (Chaibi, Farzaneh *et al.*, 1996).

### Grupo 2c

Son carbenicilinasas que presentan mayor acción sobre penicilinas que sobre cefalosporinas, son sensibles a la acción del ácido clavulánico, con punto isoeléctrico neutro y pertenecen a la clase molecular A. En este grupo se encuentran las  $\beta$ -lactamasas PSE-1, PSE-3, PSE-4, CARB-3 y CARB-4 presentes en *P. aeruginosa*, AER-1 en *Aeromonas hydrophila*, BRO-1 en *P. mirabilis* y *B. catarrhalis*.

### Grupo 2d

Este grupo incluye  $\beta$ -lactamasas que hidrolizan cloxacilina y son generalmente inhibidas por el ácido clavulánico. Son oxacilinasas con punto isoeléctrico que oscila en el rango de 6.1-7.7 y pertenecen a la clase molecular D o A. Pertenecen a este grupo OXA<sub>1</sub>, OXA<sub>4</sub> y OXA<sub>7</sub> muy frecuentes en *E. coli* y PSE<sub>2</sub> en *P. aeruginosa*. (Huovinen *et al.*, 1988) (Medeiros, Cohenford *et al.*, 1985).

### Grupo 2e

Pertenecen a este grupo cefalosporinasas que son inhibidas por bajas concentraciones de ácido clavulánico lo que las diferencia de las  $\beta$ -lactamasas del grupo 1, como por ejemplo cefalosporinasas inducible en *Proteus* descritas por Sawai y cols (Sawai *et al.*, 1982), la cefalosporinasa L<sub>2</sub> de *S. maltophilia* descrita por Saino y colaboradores (Saino *et al.* 1984) y la cefalosporinasa FEC-1 descrita en *E. coli* y *Proteus*. (Bush 1989). Pertenecen a la clase molecular A.

**Grupo 2f**

Son serin-carbapenemasas que son inhibidas débilmente por el ácido clavulánico pero no por el EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid). Pertenecen a la clase molecular A.

**• Grupo 3**

Son metal- $\beta$ -lactamasas que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas, y carbapenemes. Son pobremente inhibidas por los inhibidores clásicos excepto EDTA y p-cloromercuribenzoato (pCMB). Son las únicas  $\beta$ -lactamasas que pertenecen a la clase B. En este grupo está incluida la  $\beta$ -lactamasa L<sub>1</sub> de *P. maltophilia* con fuerte acción hidrolítica frente a imipenem y la  $\beta$ -lactamasa II de *Bacillus cereus*.

**• Grupo 4**

Son penicilinasas que no son inhibidas por el ácido clavulánico. Se han podido englobar en la clase molecular A.

**5.4.1.3.4. Producción de  $\beta$ -lactamasas**

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas que hidrolizan irreversiblemente el enlace amida del núcleo  $\beta$ -lactámico de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, transformándolos en compuestos inactivos incapaces de ejercer su acción antibiótica. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma de la bacteria o en segmentos de DNA extracromosómico, denominados plásmidos, los cuales son los responsables de la diseminación de la mayor parte de las  $\beta$ -lactamasas.

Las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas pueden ser de producción constitutiva (alto o bajo nivel) o inducible (Livermore 1995). Los genes que codifican algunas  $\beta$ -lactamasas son transportados por transposones y muchos genes son encontrados en integrones, los cuales a menudo incluyen genes que confieren resistencia a otros antibióticos (Jacoby & Muñoz-Price 2005). Las principales  $\beta$ -lactamasas responsables de la resistencia en los bacilos gramnegativos son la  $\beta$ -lactamasa inducible AmpC (clase C) y las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de amplio espectro y de

espectro extendido (BLEE clase A) (Levison 2002). La primera  $\beta$ -lactamasa codificada por plásmido en bacterias gramnegativas se descubrió en Grecia en la década de 1960. Fue nombrado TEM por el paciente del cual se aisló (Temoniera). Posteriormente, una enzima estrechamente relacionada fue descubierta y nombrada TEM<sub>2</sub>. Era idéntica en las propiedades bioquímicas de la TEM<sub>1</sub> más común pero difieren por un solo aminoácido con un cambio resultante en el punto isoeléctrico de la enzima. (Mandell *et al.*, 2012). Estas dos enzimas son las  $\beta$ -lactamasas más comunes codificadas por plásmidos en bacterias Gramnegativas, incluidas las *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae*. TEM<sub>1</sub> y TEM<sub>2</sub> hidrolizan penicilinas y cefalosporinas de espectro estrecho, como la cefalotina o cefazolina. Sin embargo, no son eficaces contra las cefalosporinas, tales como cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, o cefepima. Las  $\beta$ -lactamasas de tipo SHV codificadas cromosómicamente y mediadas por plásmidos, con una estructura molecular relacionada con las enzimas TEM, llegaron a ser muy prevalentes entre los aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae*.

#### 5.4.1.4. $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

##### 5.4.1.4.1 Generalidades

Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas que fenotípicamente se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas y cefalosporinas, incluyendo las de tercera y cuarta generación. Las BLEE son inhibidas por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam, lo que las diferencia de las  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC (Tafúr *et al.* 2008).

Derivan de las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (TEM<sub>1</sub>, TEM<sub>2</sub>, SHV<sub>1</sub>), pertenecientes al grupo 2b de la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros; cuando estas sufren mutaciones (el hecho de que se produzca un cambio de uno o más aminoácidos implica una apertura del sitio activo del enzima permitiendo un mayor acoplamiento de la gran cadena lateral del  $\beta$ -lactámico) en el centro activo dan lugar a estas otras  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, que hidrolizan a las cefalosporinas de tercera generación y a los monobactámicos, clasificándose en el

subgrupo 2be (clase molecular A); no todas las BLEE pertenecen al grupo 2be, ya que algunas oxacilinasas, que pertenecen al grupo 2d (clase molecular D), son BLEE (Philippon *et al.*, 1989) (Patterson 2003).

Son enzimas de configuración plasmídica producidas por bacilos gramnegativos, principalmente enterobacterias, en concreto *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*, pero también pueden aparecer en bacilos no fermentadores y otras enterobacterias. Son resistentes a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos con la excepción de las carbapenémicos, las cefamicinas y las combinaciones de  $\beta$ -lactámicos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Además de las BLEE clásicas, de naturaleza plasmídica, existe una serie de microorganismos que producen  $\beta$ -lactamasas cromosómicas que, en el caso de una hiperproducción, confieren fenotipos de resistencia similares al que determinan las BLEE, esto es, resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido e inhibición por el ácido clavulánico. Entre las enterobacterias que producen de forma natural este tipo de  $\beta$ -lactamasas se encuentran *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter diversus* y distintas especies del género *Kluyvera*. De hecho, en los últimos años, como se comentará posteriormente, están adquiriendo gran relevancia un nuevo tipo de BLEE plasmídicas, denominadas CTX-M que, precisamente, derivan de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica de distintas especies del género *Kluyvera*. Por lo general, cuando hablamos de BLEE nos referimos únicamente a las enzimas de codificación plasmídica ya que son éstas las que suponen un mayor problema epidemiológico debido a su elevada capacidad de diseminación.

Desde el primer informe en Alemania en 1983 (Knothe *et al.*, 1983), de la aparición de una cepa de *Klebsiella ozaenae* productoras de  $\beta$ -lactamasas espectro extendido (BLEE), *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* BLEE se ha convertido en un problema grave en pacientes hospitalizados en todo el mundo ( Guindaleza *et al.*, 2009; Livermore *et al.*, 2007; Paterson & Bonomo, 2005 ). En Taiwán, la prevalencia de los productores de BLEE se ha incrementado en los últimos años, que van desde 8,5 hasta 50,7% en *K. pneumoniae* y de 1,5 a 25,4% en *E. coli* ( Jean *et al.*, 2009 ; Kuo *et al.*, 2008 ; Yu *et al.*, 2006 ).

En España la primera BLEE se describió en 1988, aunque en estudios retrospectivos se identificaron microorganismos con perfiles de sensibilidad compatibles con la producción de BLEEs en bacterias aisladas en la comunidad de Madrid en 1985 y 1987 (Barquero *et al.*, 1987). La primera epidemia por bacterias poseedoras de BLEEs conocida en nuestro país (1988-1990) incluyó aislamientos de *K. pneumoniae* (61%), *S. marcescens* (31%), *K. oxytoca* (5%) y *E. coli* (3%). Estos aislados también eran resistentes a aminoglucósidos, cloranfenicol, sulfamidas y tetraciclinas (Fernández-Rodríguez *et al.*, 1992a).

Este mecanismo de resistencia no solo es usado para los  $\beta$ -lactámicos sino también para otro grupo de antimicrobianos como los aminoglucósidos (acetiltransferasas, adeniltransferasas, fosfotransferasas) y macrólidos (esterasas y fosfotransferasas).

#### 5.4.1.4.2. Epidemiología de las enterobacterias productoras de BLEE

La primera BLEE (SHV<sub>2</sub>) fue descrita en una cepa de *Klebsiella ozaenae* en Alemania en 1983. Desde entonces se ha publicado una gran cantidad de brotes epidémicos de enterobacterias con BLEE, sobre todo en unidades de cuidados intensivos (UCI), siendo *K. pneumoniae* la especie más frecuentemente involucrada. La primera descripción de cepas de enterobacterias productoras de BLEE en España fue en 1988 y la primera epidemia documentada ocurrió entre 1988 y 1990. Las BLEE se encuentran codificadas en plásmidos conjugativos, lo cual permite la diseminación de este mecanismo de resistencia no sólo entre distintas cepas de la misma especie sino también entre distintas especies bacterianas. Además de su codificación plasmídica, las BLEE forman parte frecuentemente de transposones o integrones lo cual determina su asociación con otros determinantes genéticos de resistencia transferibles, como los que confieren resistencia a los aminoglucósidos o al cotrimoxazol.

Durante las décadas de los 80 y principios de los 90, la inmensa mayoría de las BLEE encontradas eran del tipo TEM o SHV, habiéndose descrito hasta la fecha más de cien variantes distintas derivadas de las  $\beta$ -lactamasas TEM<sub>-1</sub> o TEM<sub>-2</sub> y más de cincuenta de SHV<sub>-1</sub> (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>), lo que da idea de la gran diversificación evolutiva que han sufrido estas enzimas en un corto periodo de tiempo debido, esencialmente, a la presión selectiva de los antibióticos. En 1989 se describió un nuevo tipo de BLEE, las cefotaximasas o CTX-M, prácticamente de forma simultánea en una cepa de *E. coli* en Alemania y en una cepa de *Salmonella spp* en Argentina. Estas enzimas se caracterizan por conferir resistencia de alto nivel a la cefuroxima, cefotaxima y cefepima, prácticamente sin incrementar las CMI de la ceftazidima, ya que la actividad hidrolítica frente a este último antibiótico es mínima comparada con la de las otras cefalosporinas. Estas BLEE, de naturaleza plásmidica al igual que las TEM o SHV, derivan de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica de distintas especies del género *Kluyvera*. También existen otras BLEE, algunas de ellas descritas en *Pseudomonas aeruginosa*, con menor importancia epidemiológica desde el punto de vista de su diseminación, al menos por el momento en España.

En los últimos años estamos asistiendo a una serie de cambios en la epidemiología de las enterobacterias productoras de BLEE. Mientras que en los años 80 y principios de los 90 la mayoría de las BLEE eran del tipo TEM o SHV, actualmente las más frecuentes en la mayoría de los países, incluyendo España, son las CTX-M. Por otro lado, *K. pneumoniae*, la especie más frecuentemente asociada con la producción de BLEE en las décadas anteriores, actualmente está siendo desplazada de forma paulatina, aunque con menor carácter epidémico, por *E. coli*. En España, si bien el porcentaje de cepas con BLEE encontradas en un estudio multicéntrico reciente (Hernández et al., 2003) fue mayor en *K. pneumoniae* (2,7%) que en *E. coli* (0,5%), el número absoluto de cepas fue significativamente superior para *E. coli*. En relación con este último punto, es cada vez más frecuente el aislamiento de enterobacterias con BLEE, especialmente *E. coli*, fuera del ámbito hospitalario, particularmente como causa de infección urinaria en pacientes de atención primaria

y así, en el estudio anteriormente aludido, se encontró que el 50% de las cepas de *E. coli* con BLEE procedían de la comunidad.

Otro aspecto epidemiológico destacable es la creciente presencia de BLEE en enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas AmpC. En este sentido, la cepa productora de BLEE, para la cual se ha documentado una mayor diseminación, es una cepa de *Enterobacter aerogenes* productora de TEM<sub>-24</sub> que ha sido la causa de brotes epidémicos en un gran número de hospitales de distintos países europeos, como Bélgica, Francia, Portugal y España.

Las BLEE han emergido en las dos últimas décadas como un problema creciente que dificulta el tratamiento de infecciones producidas por las bacterias portadoras (Gobernado 2005). Su aparición se asocia al uso excesivo de las cefalosporinas de amplio espectro y el aztreonam.

Desde su descripción inicial, se han identificado más de 300 BLEE diferentes, y la mayoría pertenece a las familias TEM, SHV y CTX-M (Navarro *et al.* 2011)

#### 5.4.1.4.3. Reservorios de *E. coli* productor de $\beta$ -lactamasa espectro extendido (BLEE)

En humanos, el principal reservorio de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido es el tracto digestivo, y su transmisión se facilita por el contacto a través de las manos, habiéndose descrito transmisión plasmídica y bacteriana de estas enzimas entre personas por contacto directo. También se ha considerado que ciertos alimentos de origen animal, debido al número de denuncias de cepas *E. coli* BLEE aisladas (Bergenholtz *et al.*, 2009), principalmente en relación con las aves de corral, podrían ser fuente de transmisión de enzimas BLEE al hombre (Goossens *et al.*, 2005; Lavilla *et al.*, 2008).

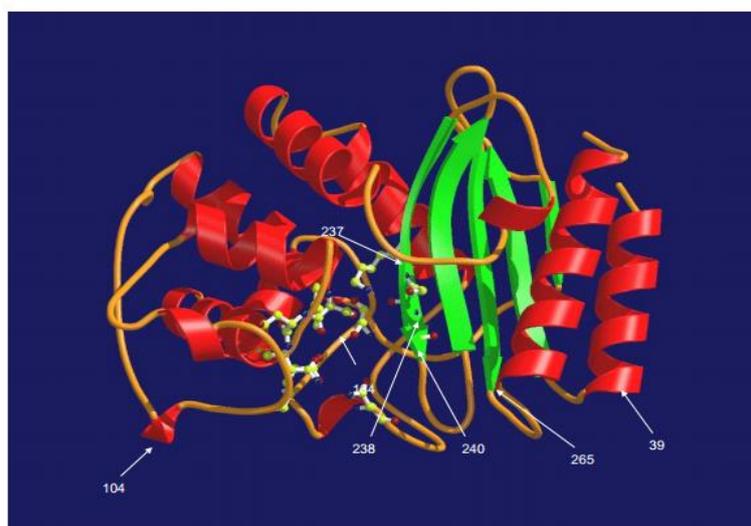
Esto plantea preguntas sobre el posible papel de los reservorios animales y alimentarias, sobre este fenómeno.

#### 5.4.1.4.4. Genotipos de $\beta$ -lactamasa espectro extendido (BLEE)

##### **Enzima TEM**

Las BLEE tipo TEM son derivadas de las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro TEM<sub>1</sub> y TEM<sub>2</sub>, por modificación en la secuencia de aminoácidos lo que provoca cambios en la estabilidad de la enzima y en el perfil hidrolítico. (Blázquez *et al.*, 1995). Figura 22

Figura 22.- Imagen tridimensional de la estructura terciaria de una  $\beta$ -lactamasa tipo TEM con el antibiótico  $\beta$ -lactámico en el sitio activo. Las flechas blancas señalan la localización de las mutaciones más frecuentemente encontradas en este tipo de  $\beta$ -lactamasa. Fuente Fonzé *et al.*, 1995.



TEM<sub>1</sub> es la  $\beta$ -lactamasa más habitual en las bacterias gramnegativas y puede hidrolizar las penicilinas y cefalosporinas de espectro reducido en las enterobacterias, *N. gonorrhoeae* y *H. influenzae* (Bradford 2001). El espectro ampliado de actividad de las BLEE tipo TEM derivadas se obtiene a través de cambios de uno o unos pocos aminoácidos que alteran la configuración de la enzima en su lugar activo. La mayoría de BLEE tipo TEM derivadas siguen siendo sensible a la inhibición por el ácido clavulánico, a pesar de que también se han descrito variantes resistentes al inhibidor. (Lefon-Guibout *et al.*, 2000).

### **Enzima SHV**

La  $\beta$ -lactamasa SHV<sub>-1</sub> (o variable de sulfhidrilo) tiene una estructura bioquímica similar a la TEM<sub>-1</sub> (comparten el 68% de aminoácidos (Jacoby *et al.*, 2005) y sus derivados BLEE también son producidos por mutaciones puntuales (una o más sustituciones de aminoácido) en su lugar activo. Las  $\beta$ -lactamasas de tipo SHV están presentes principalmente en cepas de *K. pneumoniae*.

### **Enzima CTX-M derivadas**

Las  $\beta$ -lactamasas tipo CTX-M no se relacionan evolutivamente con las familias SHV y TEM. Codificada cromosómicamente, a partir de cefotaximasas intrínsecas en *Kluyvera* spp., bacilos gramnegativos de bajo potencial patogénico (Poriel *et al.*, 2002; Humeniuk *et al.*, 2002), las cuales se proponen ser los progenitores de CTX-M. Esto se ha producido principalmente por la participación de las unidades de movilización genéticas tales como secuencias de inserción (*IS ECP1* o *ISCR1*) y la incorporación posterior de las estructuras jerárquicas asociadas con estructuras genéticas múltiples facetas, incluyendo complejos de clase 1 integrones y transposones relacionados con su movilización y difusión.

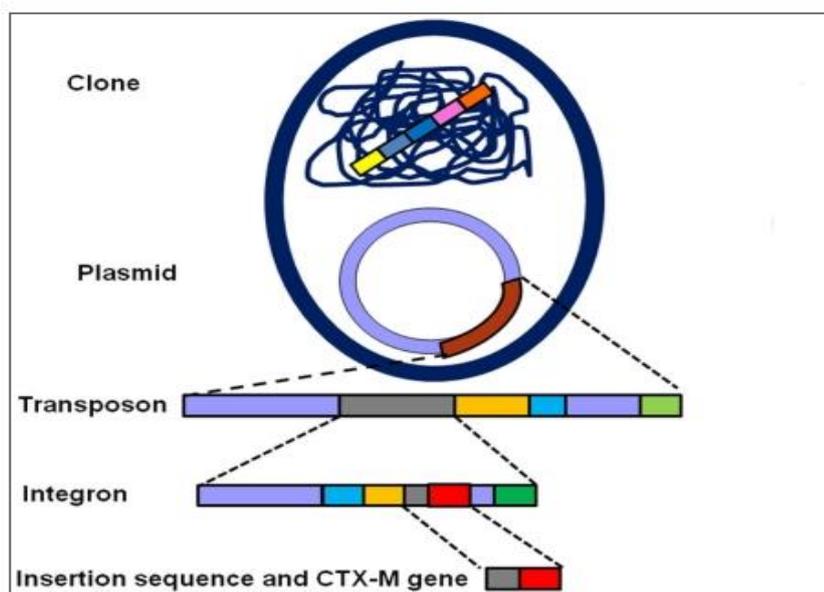
La revisión de la literatura científica, refiere que la microbiota intestinal de animales sanos destinados al consumo humano supone un reservorio de genes codificantes de  $\beta$ -lactamasas del tipo CTX-M (*bla*<sub>CTX-M</sub>) (al menos, en Europa y en Asia) (EFSA Journal 2011). Es probable que el uso de antibióticos en medicina humana esté contribuyendo a seleccionar bacterias portadoras de BLEE en la microbiota intestinal humana, pero también es muy posible que el importante reservorio de este tipo genes en la microbiota intestinal de los animales esté también favoreciendo la evolución creciente de *bla*<sub>CTX-M</sub> en el entorno humano.

Estudios realizados durante los últimos 10 años han puesto de manifiesto que a diferencia de algunas excepciones, las enzimas CTX-M casi han desplazado a otras enzimas BLEE en *Enterobacteriaceae*, incluyendo TEM y SHV variantes BLEE (Bush *et al.*, 2010)

Este desplazamiento podría haber ocurrido no sólo como consecuencia de la extraordinaria difusión de los correspondientes genes  $bla_{CTX-M}$  en plataformas genéticas altamente movilizables, incluyendo plásmidos y transposones, sino también a causa de estas plataformas dentro de clones de éxito (Rogers *et al.*, 2011). Figura 23

Otra de las razones de este aumento es el fenómeno co-resistencia en los organismos productores de CTX-M, en especial a los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas, que podría facilitar los procesos de co-selección (Cantón y Ruiz-Garbajosa, 2011)

Figura 23. - Complejidad jerárquica de genes  $bla_{CTX-M}$  dentro de las estructuras genéticas y clones bacterianos que participan en la movilización, propagación, y mantenimiento de estos genes. Copyright © 2012 Cantón, González-Alba & Galán.



En general, los miembros del grupo CTX-M hidrolizan mejor la cefotaxima y la ceftriaxona que la ceftazidima y su inhibición es mayor por tazobactam que por ácido clavulánico (Bradford 2001; Jacoby 2005). La localización plasmídica de estas  $\beta$ -lactamasas, su fácil transferencia por conjugación y su localización entre secuencias de

inserción y en integrones (Arduino *et al.*, 2002; Sabaté *et al.*, 2002a) ha facilitado la expansión y diseminación por varias zonas del mundo. Las enzimas CTX-M (*bla*<sub>CTX-M</sub>), hoy día, son las BLEE más prevalentes en Europa y Sudamérica (Canton & Croque, 2006). Publicaciones recientes sobre bacteriemias adquiridas en la comunidad con aislamientos de *E. coli bla*<sub>CTX-M</sub> multirresistentes, procedentes de España e Israel, están suscitando una **preocupación de salud pública** considerable (Ben-Ami *et al.*, 2006; Pitout *et al.*, 2008).

El mayor número de variantes de BLEE descritas en los últimos años corresponde a la familia CTX-M (123 variantes hasta 2011) (al Naiemi *et al.*, 2006). Enzimas CTX-M se pueden subdividir por similitudes de secuencia de aminoácidos (Bonnet *et al.*, 2000). Los miembros de cada grupo comparten > 94% de identidad, mientras que se observa ≤ 90% de identidad entre los miembros pertenecientes a grupos distintos. (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>).

El estudio filogenético revela cinco grandes grupos de enzimas CTX-M:

**CTX-M<sub>1</sub>, CTX-M<sub>2</sub>, CTX-M<sub>8</sub>, CTX-M<sub>9</sub>, CTX-M<sub>25</sub>**

**1. Grupo CTX-M<sub>1</sub>**

Incluye seis enzimas mediada por plásmidos:

CTX-M<sub>1</sub>, CTX-M<sub>3</sub>, CTX-M<sub>10</sub>, CTX-M<sub>12</sub>, CTX-M<sub>15</sub>, y FEC<sub>1</sub> y las enzimas no publicados: CTX-M<sub>22</sub>, CTX-M<sub>23</sub>, y CTX-M<sub>28</sub>

**2. Grupo CTX-M<sub>2</sub>**

Incluye ocho enzimas CTX-M mediadas por plásmidos:

CTX-M<sub>2</sub>, CTX-M<sub>4</sub>, CTX-M<sub>4L</sub>, CTX-M<sub>5</sub>, CTX-M<sub>6</sub>, CTX-M<sub>7</sub>, CTX-M<sub>20</sub>, y Toho<sub>1</sub>

**3. Grupo CTX-M<sub>8</sub> incluye un solo enzima mediada por plásmidos**

#### 4. Grupo CTX-M<sub>9</sub>

Incluye nueve enzimas mediada por plásmidos:

CTX-M<sub>9</sub>, CTX-M<sub>-13</sub>, CTX-M<sub>-14</sub>, CTX-M<sub>-16</sub>, CTX-M<sub>-17</sub>, CTX-M<sub>-19</sub>, CTX-M<sub>-21</sub>, CTX-M<sub>-27</sub>, y Toho<sub>-2</sub>

#### 5. Grupo CTX-M<sub>-25</sub>

Incluye:

CTX-M<sub>-25</sub> y CTX-M<sub>-26</sub>

Las enzimas Toho<sub>-1</sub> y Toho<sub>-2</sub> son  $\beta$ -lactamasas relacionadas estructuralmente con las  $\beta$ -lactamasas tipo CTX, como estas, presentan una actividad más potente frente a cefotaxima. La denominación de Toho se refiere al nombre del hospital en Japón donde fue aislada una cepa de *E.coli* productor de esta  $\beta$ -lactamasa. En la actualidad son CTX-M<sub>-44</sub> y CTX-M<sub>-45</sub> respectivamente (Paterson & Bonomo 2005). Las  $\beta$ -lactamasas CTX-M excepto Toho<sub>-2</sub> poseen 291 residuos aminoacídicos. El rango de pI es de 7.4-9 (Bonnet 2004)

Al igual que ocurre con las  $\beta$ -lactamasas SHV y TEM existe una relación importante entre estructura y función. Los aminoácidos en posición 240 y 267 juegan un papel importante en la evolución de estas  $\beta$ -lactamasas. Las enzimas CTX-M<sub>-15</sub>, CTX-M<sub>-27</sub>, CTX-M<sub>-16</sub>, derivan de CTX-M<sub>-3</sub>, CTX-M<sub>-9</sub>, CTX-M<sub>-14</sub> respectivamente, por sustitución de Gly-240→Asp presentando una potente acción frente a ceftazidima. (Poirel *et al.*, 2002). La  $\beta$ -lactamasa CTX-M<sub>-19</sub> deriva de CTX-M<sub>-18</sub> por sustitución de Pro-167→Ser lo que le proporciona mayor actividad frente a ceftazidima. (Poirel *et al.*, 2002).

Otros residuos aminoacídicos juegan también un papel importante como son Arg-276, la sustitución de asparragina por arginina confiere bajo nivel de resistencia a cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam, estos resultados indican que la Arg-276 podría estar implicada en la hidrólisis de los oximino  $\beta$ -lactámicos, por otra parte el residuo Arg-276 ocupa el mismo lugar que el residuo Arg-244 en otras  $\beta$ -lactamasas de la clase



(*bla*<sub>CTX-M-9</sub> y *bla*<sub>CTX-M-14</sub>), y uno en cada uno de CTX-M-8 y CTX-M-25 (*bla*<sub>CTX-M-8</sub> y *bla*<sub>CTX-M-25</sub>)

Hasta finales de 1990 las BLEE más frecuentemente encontradas eran derivadas de TEM y SHV principalmente en *K. pneumoniae* y en pacientes hospitalizados (Yuan *et al.*, 1998) En la actualidad las enzimas CTX-M están reemplazando a las TEM y SHV y está aumentando el porcentaje de aislamientos en *E. coli* y en pacientes comunitarios. En España la CTX predominante es el grupo CTX-M<sub>9</sub> (Livermore *et al.*, 2007).

### **Enzimas OXA derivadas**

Las  $\beta$ - lactamasas tipo OXA (clase molecular D, grupo funcional 2d), hidrolizan la oxacilina y sus derivados eficazmente (Abraham & Chain, 1940). Están codificadas tanto en cromosomas como en plásmidos. Todas estas enzimas confieren resistencias a la ampicilina y a la cefalotina, aunque se caracterizan por su alta actividad hidrolítica frente a la oxacilina y a la cloxacilina y por el hecho de que son poco inhibidas por el ácido clavulánico (Bush, *et al.*, 1995). Las BLEE OXA derivadas, se han descrito principalmente en *P. aeruginosa* en las que le confieren una resistencia de alto nivel a  $\beta$ -lactámicos oximino aisladas en Turquía y Francia (Bradford 2001).

### **Enzimas AmpC**

Las  $\beta$ - lactamasas AmpC (clase molecular C), se caracterizan por su espectro de hidrolisis (actividad cefalosporinasa) y por su perfil de inhibición. Las AmpC hidrolizan cefalosporinas de primera (cefalotina) y segunda generación (cefuroxima), incluidas las cefamicinas (cefotitina y cefotetán) y, en menor medida, las de tercera generación (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima), mientras que son generalmente muy pocos eficaces hidrolizando las cefalosporinas de cuarta generación (cefepima y cefpiroma) y los carbapenémicos (imipemen y meropenem). Desde el punto de vista epidemiológico, las AmpC plasmidicas tienen mayor relevancia o trascendencia que las AmpC cromosómicas, debido a su capacidad para movilizarse y se pueden transferir tanto en el ambiente nosocomial, donde tiene un claro potencial epidémico, como en la comunidad.

### **Enzimas Carbapenemasas**

Las carbapenemasas confieren el mayor espectro de resistencia antimicrobiana, porque no solo pueden hidrolizar a los carbapenémicos sino también a las penicilinas de amplio espectro, oximinocefalosporinas y cefamicinas. Hoy día, las enzimas KPC son las carbapenemasas más importantes de clase serina A. Las metalo- $\beta$  lactamasas de clase B usan el catión  $Zn^{2+}$  para la hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico, son vulnerables a los quelantes de iones, como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y resistentes al ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam. Confieren resistencia a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos excepto los monobactams. Codificadas cromosómicamente. Las más importantes desde un punto de vista clínico pertenecen a cinco familias diferentes (IMP, VIM, SPM, GIM y SIM). En general, se transmiten por los elementos génicos móviles insertados en los integrones y se han propagado a través de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, otros patógenos no fermentadores gramnegativos y patógenos bacterianos entéricos (Tao *et al.*, 2007).

La resistencia a los carbapenémicos no solo es debida a la producción de Carbapenemasas, ya que existen otros mecanismos que pueden afectar a su actividad, como son: pérdida de porinas específicas, bombeo o expulsión del antibiótico y modificaciones en las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) (Poirel, Heritier *et al.*, 2004).

Atendiendo a la clasificación molecular de Ambler, las carbapenemasas pueden clasificarse en tres grupos: clase A, clase B y clase D:

- **Carbapenemasas clase A**

Pertenecen al grupo 2f de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros. Son inhibidas débilmente por el ácido clavulánico pero no por el EDTA (Bush, Jacoby *et al.*, 1995). Puede ser de producción cromosómica (NMC-A, Sme<sub>-1</sub>, Sme<sub>-3</sub> y IMI<sub>-1</sub>) *Enterobacter cloacae* y *Serratia marcescens*, o codificadas por plásmidos, como KPC<sub>-1</sub> en *K. pneumoniae* y GES<sub>-2</sub> en *Pseudomonas aeruginosa* (Nordmann & Poirel 2002).

Los primeros aislamientos se produjeron en Japón en 1990 tanto en especies de Enterobacterias como en *Pseudomonas* y *Acinetobacter*. Más tarde han sido informados aislamientos en otras partes del mundo como Europa, Canadá y Brasil (Jacoby & Muñoz-Price 2005). En la actualidad se ha informado un aislamiento en *Enterobacter asburiae* con IMI<sub>2</sub> la primera carbapenemasa codificada por plásmidos e inducible (Aubron, Poirel *et al.*, 2005).

- **Carbapenemasas clase B**

Son las Carbapenemasas más significativas desde el punto de vista clínico. Pertenecen al grupo 3 de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros, son metaloenzimas, requieren zinc para su actuación y son generalmente de naturaleza cromosómica, aunque recientemente se han asociados a plásmidos conjugativos e integrones (Toleman, Rolston *et al.*, 2004). Son inhibidas por EDTA, pero no por ácido clavulánico. Estas enzimas hidrolizan a las penicilinas, cefalosporinas y cefamicinas pero no al aztreonam (Livermore 1995).

- **Carbapenemasas clase D**

A este grupo pertenecen algunas  $\beta$ -lactamasas tipo OXA que presentan una débil actividad carbapenemasa (Poirel, Heritier *et al.*, 2004) (Jacoby & Bush 2005). Han sido descritas en *Acinetobacter baumannii* y disminuyen la sensibilidad a imipenem y meropenem (Nordmann & Poirel 2002).

### **Enzimas $\beta$ -lactamasas de amplio espectro**

Dentro de este grupo están incluidas TEM<sub>-1</sub>, TEM<sub>-2</sub>, SHV<sub>-1</sub> y las de tipo OXA.

### **Enzimas IRT**

Estas enzimas derivan de las  $\beta$ -lactamasas clásicas y se caracterizan por conferir resistencia a amino-, carboxi- y ureidopenicilinas, son insensibles a la acción de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasa, y no tienen actividad sobre el resto de  $\beta$ -lactámicos. Se han denominado IRT (inhibitor-resistant TEM) porque en su mayoría derivan de TEM<sub>-1</sub> y TEM<sub>-2</sub>, aunque también se han descrito derivadas de SHV<sub>-1</sub>. (Chaibi *et al.*, 1999)

#### **5.4.2 Fracaso del antibiótico para atravesar la membrana externa de los microorganismos gramnegativos para alcanzar las PBP.**

La membrana externa de los microorganismos gramnegativos es una barrera importante a la penetración de los fármacos y un elemento importante de resistencia. Las  $\beta$ -lactamasas de las bacterias gramnegativas están localizadas en el espacio periplasmático, que se encuentra entre la membrana citoplasmática interna y la membrana externa de lipopolisacáridos, donde se concentra de forma estratégica las  $\beta$ -lactamasas para proteger a las PBP de la exposición a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos activos. Las moléculas polares de pequeño tamaño (por ej., glucosa, nutrientes esenciales, antibióticos  $\beta$ -lactámicos) atraviesan esta barrera a través de canales proteicos denominados porinas. Las porinas restringen la entrada de las moléculas a la célula en función de su tamaño, estructura y carga. Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos que cumplen los requerimientos de entrada pueden atravesar los canales de porinas hacia el espacio periplasmático, donde se unen a las PBP objetivo. La ausencia o la delección de una porina crucial, por lo general en presencia de la actividad  $\beta$ -lactamasa, puede inducir resistencia. (Mesaros *et al.*, 2007; Bonfiglio *et al.*, 1998; Crowley *et al.*, 2002)

#### **5.4.3. Bombeo del fármaco a través de la membrana externa de las bacterias gramnegativas.**

El fármaco que entra en el espacio periplasmático se bombea de vuelta a través de la membrana externa (Zgurskaya *et al.*, 2000; Thomson *et al.*, 2005). El bombeo puede funcionar de forma independiente a otros mecanismos, pero, con más frecuencia, la exclusión del antibiótico por las porinas, la destrucción del antibiótico por las  $\beta$ -lactamasas o ambas pueden contribuir a la resistencia al limitar la concentración del antibiótico en el espacio periplasmático. Las diferencias entre especies en las porinas, las bombas, las  $\beta$ -lactamasas y las PBP objetivo determinan si el microorganismo es sensible o resistente a un antibiótico concreto.

#### 5.4.4. Unión de baja afinidad del antibiótico a las PBP objetivo.

Este mecanismo implica la producción de una PBP con baja afinidad de unión a un antibiótico  $\beta$ -lactámicos (Zapun *et al.*, 2008). Esto puede deberse a mutaciones en genes de las PBP que disminuyen esa afinidad de unión, como en los neumococos o especies de *Neisseria* resistentes a penicilina, o deberse a la presencia de PBP adicionales de baja afinidad como la PBP<sub>5</sub> producida por *Enterococcus faecium* o la PBP<sub>2a</sub> producida por los estafilococos resistentes a la meticilina. Mediante la disolución de las estructuras cristalinas de las PBP de baja afinidad se han identificado características moleculares e interacciones fundamentales causantes de la resistencia (Lim *et al.*, 2006)

## II.6.

### **BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos**

---

En la actualidad existe una gran preocupación por el incremento observado de cepas clínicas portadoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), fundamentalmente en aislados procedentes de pacientes de la comunidad (Paterson *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2005) y por la importancia que están adquiriendo ciertos tipos de  $\beta$ -lactamasas, especialmente las del grupo CTX-M (Bonnet *et al.*, 2004; Livermore *et al.*, 2007), que están desplazando a otras predominantes de los tipos TEM o SHV. Además, mientras que en un principio *Klebsiella* era el género que con mayor frecuencia se refería asociado a la presencia de BLEE, ahora está teniendo una especial relevancia la especie *Escherichia coli* en relación con este mecanismo de resistencia. Asimismo, se observa un aumento en la prevalencia de portadores fecales de bacterias productoras de BLEE, tanto en pacientes hospitalizados como en pacientes de la comunidad (Mirelis *et al.*, 2003; Valverde *et al.*, 2004), y se desconocen los factores que pueden estar involucrados en estos procesos.

En los últimos años, distintas publicaciones hacen referencia a la detección de bacterias (fundamentalmente *E. coli* y en menor medida *Salmonella*) portadoras de BLEE en muestras fecales de distintos tipos de animales sanos, tanto animales destinados al consumo humano como animales de compañía y animales salvajes (Li *et al.*, 2007). Por otro lado, también se está evidenciando un aumento en la detección de cepas clínicas de animales portadoras de BLEE, lo que puede representar asimismo un problema en el tratamiento de las enfermedades infecciosas en veterinaria.

Los animales son reconocidos como un depósito *E. coli* patogénica extraintestinal, pero si los animales son una fuente para ExPEC humana sigue siendo un tema de debate. Patologías causadas por ExPEC se presentan en muchos animales de granja,

especialmente para las aves de corral, en el que la colibacilosis es responsable de enormes pérdidas en los pollos de engorde. Los casos también se reportan para los animales de compañía. Cepas *E. coli* comensal que llevan potencialmente factores de virulencia implicados en el desarrollo de patologías humanas también colonizan el tracto intestinal de los animales.

### 6.1 Uso de antibióticos $\beta$ -lactámicos en animales

Los antibióticos pueden ser utilizados en producción animal con fines terapéuticos, para el tratamiento de enfermedades, o con fines profilácticos, como control y prevención (esta práctica es especialmente importante cuando resulta imposible tratar por separado a cada individuo). Hasta hace pocos años, también se podían emplear los antibióticos como aditivos en el pienso como promotores del crecimiento de los animales destinados al consumo, aunque ya no está permitido en Europa. El empleo de antibióticos en veterinaria y su relación con el aumento de la resistencia en bacterias de importancia en clínica humana y animal, y sus consecuencias en salud humana, es un tema de amplio debate en los últimos años.

Las penicilinas son antibióticos ampliamente utilizados en veterinaria, pero el uso de las cefalosporinas es menor y, en general, los tratamientos son de muy corta duración. En general, las cefalosporinas de primera generación se emplean para el tratamiento de mastitis en ganado lechero. El ceftiofur, una cefalosporina de tercera generación y de uso exclusivo veterinario, se emplea en todo el mundo (Europa, EE.UU., Asia) para el tratamiento de enfermedades respiratorias en ganado vacuno, ovino, caprino, equino y porcino. También se emplea en ciertos países de América, pero no en Europa, en pollitos de un día para prevenir la mortalidad temprana debida a procesos septicémicos (Hornish *et al.*, 2002).

El uso animal de agentes antimicrobianos que se consideran críticos o muy importante para el uso en humanos crea un reservorio de bacterias resistentes y genes de resistencia que se suma a la carga de la resistencia a los antimicrobianos en la medicina humana y puede acortar el tiempo que estos valiosos agentes

antimicrobianos estarán disponibles para el tratamiento eficaz de las infecciones en los seres humanos. Los seres humanos pueden obtener *E. coli* multirresistente o genes de resistencia de origen animal, directamente a través del contacto con los animales, a través de los alimentos de origen animal o del medio ambiente. Estas bacterias pueden colonizar posteriormente los seres humanos o pueden transferir los genes de resistencia a otras bacterias durante el paso a través del tracto intestinal. Aunque el transporte de *E. coli* multirresistente en el intestino no es un peligro para la salud humana en sí misma, puede dar lugar a una infección bacteriana con opciones terapéuticas limitadas y un mayor riesgo de fracaso del tratamiento. La contribución del reservorio animal a la carga de la resistencia a los antimicrobianos en los seres humanos no ha sido cuantificado, sin embargo, el uso de agentes antimicrobianos considerado como crítico o muy importante para su uso en seres humanos debe ser evitado o minimizado en animales productores de alimentos, para preservar la eficiencia de estos agentes antimicrobianos para el tratamiento de la infección en los seres humanos. Como los alimentos de origen animal a su vez se exportan e importan a muchos países, las intervenciones para combatir la resistencia a los antimicrobianos a nivel nacional pueden ser insuficientes para mejorar la protección de los consumidores, se necesita la cooperación internacional para controlar la propagación de la resistencia a los antimicrobianos a través de animales y alimentos.

## 6.2 *E. coli* productor de $\beta$ -lactamasas de origen animal y alimentario

En la Tabla 9, se presenta una relación de BLEE que se han detectado y publicado hasta la fecha en cepas de *E. coli* de origen animal en función de la especie animal en la que fueron detectadas y el carácter sano de los animales. La primera publicación sobre la detección de BLEE en bacterias de origen animal tuvo lugar en 2000 y hacía referencia a una cepa de *E. coli* portadora de SHV<sub>-12</sub>, aislada en 1998 en España en un perro enfermo (Teshager *et al.*, 2000). A partir de esta fecha, el número de publicaciones que refieren la detección de cepas de *E. coli* productoras de BLEE ha sido creciente, e incluye animales destinados al consumo humano (España, Francia,

Dinamarca, Reino Unido, Japón, y China), animales de compañía (España, Italia y Portugal) e incluso animales salvajes (Portugal). La mayor parte de las investigaciones se realizaron en Europa y 3 estudios, en países asiáticos, en concreto, en China y en Japón.

Tabla 9. - Enzimas BLEE descritas en cepas de *Escherichia coli* de origen animal.

Tipo de animal	Año de aislamiento	País	BLEE descritas	
			Tipo CTX-M	Otras BLEE
Especies destinadas al consumo humano. Animales sanos (muestras fecales)				
Aves	2000-2001	España	CTX-M <sub>-14</sub>	SHV <sub>-12</sub>
	1999-2002	Japón	CTX-M <sub>-2, -14</sub>	
	2002	China	CTX-M <sub>-14</sub>	
	2003	España	CTX-M <sub>-9, -14</sub>	SHV <sub>-12</sub>
	2003	España	CTX-M <sub>-1, -9, -14, -32</sub>	SHV <sub>-2, -5, -12</sub> TEM <sub>-52</sub>
	2004	Portugal	CTX-M <sub>-14, -32</sub>	TEM <sub>-52</sub>
	2005	Portugal		TEM <sub>-52</sub>
	2005	Francia	CTX-M <sub>-1</sub>	
	2007	Bélgica	CTX-M <sub>-1, -2, -14, -15</sub>	TEM <sub>-52</sub> , TEM <sub>-106</sub>
	2009	Dinamarca	CTX-M <sub>-1, -2, -9</sub>	
	2007	Italia	CTX-M <sub>-1, -32</sub>	SHV <sub>-12</sub>
	2006	Netherlands	CTX-M <sub>-1, -2</sub>	SHV <sub>-2</sub> TEM <sub>-52</sub>
	2006-2007	China	CTX-M <sub>-14, -3, -15, -64, -24, -55, -65</sub>	
	2008	Czech Republic	CTX-M <sub>-1</sub>	SHV <sub>-12</sub>
	Cerdos	2002	China	CTX-M <sub>-3, -14, -24</sub>
2003		España	CTX-M <sub>-1</sub>	SHV <sub>-12</sub> , SHV <sub>-5</sub>
2005		China	CTX-M <sub>-14</sub>	
Conejos	2003	España	CTX-M <sub>-9, -14</sub>	
Vacuno	2000-2001	Japón	CTX-M <sub>-2</sub>	
	2002	China	CTX-M <sub>-13</sub>	
	2004	Dinamarca <sup>a</sup>		TEM <sub>-52</sub>
	2004-2005	Reino Unido	CTX-M <sup>b</sup>	

BLEE:  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.

a. Cepa aislada de alimento importado de Alemania

b. Los autores no indican el tipo de gen *bla*<sub>CTX-M</sub> detectado.

### 6.3 *E. coli* productor de $\beta$ -lactamasas en animales destinados al consumo humano

Los animales para el consumo colonizados por *E. coli* productor de BLEE se han considerado como posibles fuente de cepas de *E. coli* multirresistentes causantes de infecciones en la comunidad, ya que, pueden adquirir, mantener y transmitir genes de resistencia procedentes de otros organismos en el medio ambiente. Estas cepas se han detectado cada vez más en los alimentos de origen animal en diferentes países desde 2002 y han ganado considerable atención en todo el mundo. (Junying *et al.*, 2012).

Según un informe publicado por la *European Food Safety Authority* (EFSA) en el año 2011, es particularmente complicado determinar los factores de riesgo para la aparición de BLEE por la falta de disponibilidad de datos o falta de precisión. El uso de los antimicrobianos es un factor de riesgo de la selección y la propagación de clones resistentes, genes de resistencia y plásmidos. Como la mayoría de las cepas BLEE llevan resistencias adicionales a otros de uso común medicamentos veterinarios, el uso genérico de los antimicrobianos es un factor de riesgo de BLEE y no se limita específicamente al uso de cefalosporinas. Otro de los factores de riesgo es el intenso comercio de animales en miembros de la UE. Por otro lado, no hay datos sobre la eficiencia comparativa de opciones de control individuales para reducir los riesgos de salud pública causados por BLEE y bacterias productoras relacionadas con los animales productores de alimentos. La asignación de prioridades es compleja, pero se considera que una opción de control muy eficaz sería limitar o restringir el uso sistemático de las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, permitiendo sólo su uso a circunstancias específicas. Existen pocos estudios que describen una clara evidencia de la transmisión directa de *E. coli* BLEE aisladas de animales productores de alimentos o alimentos para los seres humanos. Aunque existen datos sobre clones comunes *E. coli* BLEE en los seres humanos y animales productores de alimentos, que proporcionan evidencia indirecta sobre esta transmisión. Hallazgos recientes indican que es más probable que la transmisión de los genes de BLEE, plásmidos y clones de aves de corral a los seres humanos ocurra a través de la cadena alimentaria. Además, la evidencia de

propagación de microorganismos portadores de BLEE a través del contacto directo con animales o indirectamente a través del medio ambiente es limitada.

Sin embargo, las personas que trabajan con las aves de corral tienen un riesgo mayor para el transporte intestinal de bacterias BLEE.

El primer informe de la detección de BLEE en los animales productores de alimentos se realizó en aislados de *E. coli* recuperado durante el período 2000-2001 a partir de muestras fecales de pollos sanos a nivel matadero obtenida como parte del programa de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos Español (Brinas *et al.*, 2003b). En ese estudio, 120 aislados de *E. coli* se obtuvieron a partir de muestras fecales. Se detectaron CTX-M<sub>-14</sub> y SHV<sub>-12</sub> en el 1,6% de ellos. En un segundo estudio realizado en el 2003 se encontró un aumento en el porcentaje de productores de BLEE *E. coli* aislados entre aislamientos fecales comensales (8 de 158 aislamientos, 5%), con una mayor diversidad de BLEE detectadas (CTX-M<sub>-9</sub>, CTX-M<sub>-14</sub> y SHV<sub>-12</sub>) (Brinas *et al.*, 2005).

Por otro lado, en un estudio realizado en Estados Unidos durante los años 2002-2008 donde se examinaron muestras de carne comercializadas, los *E.coli* aislados en carne de aves de corral presentaron mayor porcentaje de resistencia a los antibióticos (S. Zhao, et al 2012).

También existen numerosos estudios sobre la relación de *E.coli* BLEE aislados en animales para el consumo y las cepas humanas. Por ejemplo, en el estudio español de Cortés et al. 2010, se aislaron y se caracterizó el potencial patógeno de cepas resistentes de *E. coli* a partir de muestras de pollo y cerdo en granjas. Entre los 86 aislamientos de granja, 23 (26,7%) tenían dos o más genes de virulencia típica de *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC). De éstos, 20 fueron aislados de granjas avícolas y sólo 3 de las granjas porcinas. Cuatro de estos grupos contenían cepas con dos o más genes de virulencia. En dos de estos grupos, los genes de virulencia y perfiles de electroforesis de gel en campo pulsado fueron muy similares a los de la clínica cepas humanas. Concluyeron que se necesitan más estudios para determinar el verdadero potencial zoonótico de los grupos clonales hallados. Los resultados hacen especial

hincapié en el riesgo zoonótico que plantea especialmente por las granjas de aves de corral, pero también por las granjas de cerdos, como reservorios de *E.coli* BLEE.

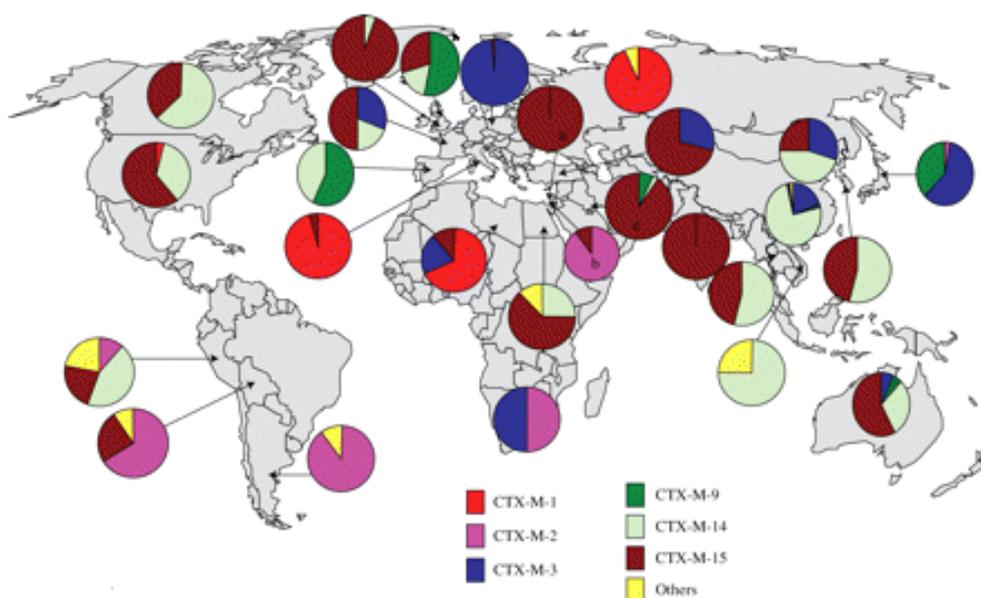
En España se han llevado a cabo varios estudios en animales de abasto. En primer lugar, y a través de una colaboración realizada entre la Universidad de La Rioja y la Red de Vigilancia Veterinaria de la Resistencia a Antimicrobianos (Universidad Complutense de Madrid), se realizó un muestreo para la detección de BLEE en cepas de *E. coli* procedentes de muestras fecales de pollos recogidas en matadero; se realizó el aislamiento de las cepas en medios de cultivo no suplementados con antibióticos, y se analizó una cepa por muestra (un lote de animales supone una muestra). En un primer muestreo, realizado en 2000- 2001, se detectaron cepas de *E. coli* portadoras de SHV<sub>-12</sub> o CTX-M<sub>-14</sub> en el 1,6% de los aislados analizados (Briñas *et al.*, 2003). En un segundo muestreo, realizado en 2003, con la misma metodología, se evidenció un incremento en el porcentaje de cepas de *E. coli* portadoras de BLEE (5%) y en su diversidad (CTX-M<sub>-14</sub>, CTX-M<sub>-9</sub> y SHV<sub>-12</sub>) (Briñas *et al.*, 2005). En Cataluña se ha llevado a cabo asimismo un amplio estudio de detección y caracterización de BLEE en cepas de *E. coli* obtenidas en granjas de pollos, cerdos y conejos (Blanc *et al.*, 2006; Mesa *et al.*, 2006), utilizando para el aislamiento placas suplementadas con cefotaxima; se detectó un mayor número y variedad de BLEE entre las cepas de *E. coli* de pollos (CTX-M<sub>-1</sub>, CTX-M<sub>-14</sub>, CTX-M<sub>-9</sub>, CTX-M<sub>-32</sub>, SHV<sub>-12</sub>, SHV<sub>-2</sub>, SHV<sub>-5</sub> y TEM<sub>-52</sub>), y un menor número y variedad entre las cepas de cerdos (CTX-M<sub>-1</sub>, SHV<sub>-12</sub> y SHV<sub>-5</sub>) o de conejos (CTX-M<sub>-14</sub> y CTX-M<sub>-9</sub>) (Blanc *et al.*, 2006).

Se han realizado estudios de caracterización de BLEE en heces de animales sanos destinados al consumo humano en otros países, como Japón, donde se detectó la presencia de CTX-M<sub>-2</sub> y CTX-M<sub>-14</sub> en pollos (Kojima *et al.*, 2005), y CTX-M<sub>-2</sub> en ternera (Shiraki *et al.*, 2004). Distintos tipos de BLEE, como CTX-M<sub>-3</sub>, CTX-M<sub>-13</sub>, CTX-M<sub>-14</sub>, CTX-M<sub>-24</sub> y CTX-M<sub>-27</sub>, se han detectado en aves, vacas y cerdos en China (Duan *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007). Por otro lado, también se ha observado TEM<sub>-52</sub> en una cepa de *E. coli* de una muestra alimentaria de ternera en Dinamarca (Jensen *et al.*, 2006).

En los últimos años varias publicaciones ponen de manifiesto la implicación de cepas de *E. coli* portadoras de BLEE en procesos infecciosos en distintos animales destinados al consumo humano (aves, cerdos, vacas y conejos). Estos trabajos se han realizado en España, Francia, Dinamarca, Reino Unido y China, y en ellos se ha identificado la presencia de CTX-M<sub>-1</sub>, CTX-M<sub>-9</sub>, CTX-M<sub>-14</sub>, CTX-M<sub>-15</sub>, SHV<sub>-12</sub> y TEM<sub>-52</sub>.

En la actualidad, las  $\beta$ -lactamasas CTX-M son consideradas como las BLEE más ampliamente diseminadas en diferentes partes del mundo, y son las más prevalentes en países de Europa y Sur América (Canton, 2006; Mella, 2001; Valenzuela *et al.*, 2005; Quinteros *et al.*, 2003). Desde cuando Bauerfeind *et al.*, (1990) describieron la primera CTX-M, se ha observado una rápida y extensa aparición de nuevas CTX-M y, a la fecha, ya se han descrito más de 110 variantes, clasificadas de acuerdo con la similitud de sus secuencias en cinco grupos filogenéticos (CTX-M<sub>-1</sub>, CTX-M<sub>-2</sub>, CTX-M<sub>-8</sub>, CTX-M<sub>-9</sub> y CTX-M<sub>-25</sub>) (Bonnet, 2004; Grupo de Bioinformática, s. f.)

Figura 25.- Países en los que se ha detectado cepas de *Escherichia coli* de origen animal portadoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro expandido (BLEE). Distribución global del genotipo CTX-M. Copyright© 2013 British Society for Antimicrobial Chemotherapy



De la Figura 25, podemos extraer que la mayor diversidad de BLEE detectadas en animales se localiza en la península Ibérica (España y Portugal) en relación con otros países europeos, hecho que puede estar relacionado con el mayor número de animales y especies estudiadas en estos países. Se debe señalar, asimismo, la detección en países asiáticos (Kojima *et al.*, 2005; Duan *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Shiraki *et al.*, 2004) de algunas variantes (CTX-M<sub>-2</sub>, -3, -13, -24, y -27) que no se han encontrado, por el momento, en *E. coli* de origen animal en Europa. Además, CTX-M<sub>-15</sub> se ha detectado sólo en Francia y Reino Unido.

En la actualidad, no podemos descartar que los viajes internacionales y la inmigración pudieran haber contribuido durante los años 1990 y la década de 2000 a la rápida aparición y difusión de las enzimas CTX-M en diferentes países y zonas geográficas. Esto se ha demostrado recientemente con carbapenemasas y en particular con los organismos NDM-1 metalo- $\beta$ -lactamasas (Kumarasamy *et al.*, 2010). Sin embargo, la presencia de enzimas CTX-M en los animales y sobre todo en los productos alimenticios crudos que fueron transportados de un país a otro sugiere posibles vías para la difusión (Matsumoto *et al.*, 2007; Warren *et al.*, 2008; Dhanji *et al.*, 2010). Por último, la globalización de las enzimas CTX-M es ilustrado por su presencia no sólo en los animales de abasto y compañía, sino también en animales salvajes (Bonnedahl *et al.*, 2010; Literak *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2011, Silva *et al.*, 2011). Además, han sido aisladas en compartimentos ambientales (Chen *et al.*, 2010; Dhanji *et al.*, 2011a).

#### 6.4. Enterobacterias productoras $\beta$ -lactamasas de tipo CTX-M en humanos y animales

Cuando se comparan los tipos de CTX-M predominantes en bacterias de origen humano en distintos países (Bonnet *et al.*, 2004; Livermore *et al.*, 2007), con los tipos de CTX-M detectados en cepas de origen animal, se evidencia una cierta relación entre la distribución geográfica de cada tipo de CTX-M en las cepas de origen humano y las de origen animal. En este sentido, se puede realizar las siguientes observaciones: 1) las cepas portadoras de CTX-M son muy infrecuentes en humanos en EE.UU, y tampoco se han detectado en animales en este país; 2) en España, las CTX-M predominantes en

bacterias clínicas o comensales de origen humano son las del grupo 9 (CTX-M<sub>9</sub> y CTX-M<sub>14</sub>) y estas BLEE también son predominantes en animales sanos de consumo humano en este país; 3) el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> es mayoritario en cepas de humanos en Francia y Reino Unido, y precisamente este gen se ha detectado en cepas de origen animal sólo en estos dos países; 4) la  $\beta$ -lactamasa CTX-M<sub>2</sub> predomina en bacterias de origen humano en Bélgica, y se ha detectado esta enzima en cepas de *Salmonella* aisladas de animales en ese país y en el país vecino Holanda (también en Irlanda); 5) la enzima CTX-M<sub>3</sub> es predominante en humanos en países de Europa del Este, y en el caso de animales, sólo se ha detectado en cepas de *E. coli* aisladas en China.

Los estudios realizados hasta la fecha acerca de los entornos genéticos de distintos genes *bla*<sub>CTX-M</sub> en bacterias de origen animal (Meunier *et al.*, 2006; Costa. *et al.*, 2006; Riaño *et al.*, 2006; Briñas *et al.*, 2005) han demostrado, con algunas excepciones, una gran similitud con los entornos genéticos detectados en bacterias de origen humano.

*¿Por qué se produce esta gran diseminación de bacterias portadoras de BLEE en la microbiota intestinal de animales sanos?*

La enorme diseminación de cepas de *E. coli* portadoras de BLEE, fundamentalmente de la clase CTX-M, en la microbiota intestinal de animales sanos es realmente preocupante, y su evolución parece haber ido de manera paralela, aunque en una escala muy superior en animales, al aumento en la detección de este tipo de bacterias resistentes en el ecosistema intestinal de humanos. Aunque las primeras descripciones de estas enzimas en cepas clínicas de humanos datan de finales de los años ochenta, no ha sido hasta la actual década cuando se está produciendo un importante y “explosivo” aumento.

El empleo de cefalosporinas de amplio espectro en animales podría ser un factor de selección de bacterias portadoras de BLEE. En aves, el uso de estos antibióticos está más restringido que en otras especies animales y, sin embargo, se detectan con mayor frecuencia bacterias portadoras de CTX-M en su microbiota intestinal. Esto nos hace, pensar que el uso de cefalosporinas de amplio espectro no es el único factor implicado en este proceso. Generalmente, los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> se localizan en plásmidos que

confieren multirresistencia y además, en ocasiones, están incluidos en estructuras de tipo integrón (Cantón *et al.*, 2006) asociadas a genes de resistencia a antibióticos como sulfamidas, trimetoprim o estreptomicina, entre otros. Se podría pensar en procesos de co-selección por el uso de antibióticos no  $\beta$ -lactámicos como sulfamidas, trimetoprim, aminoglucósidos o quinolonas, muy empleadas en avicultura, ya que en muchas ocasiones, los genes de resistencia a dichos antibióticos se encuentran en los mismos elementos genéticos (plásmidos o integrones) que los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>. Por otro lado, el **sistema de cría intensiva y el hacinamiento** al que se ven sometidos con frecuencia los animales, facilitan enormemente tanto el intercambio de bacterias entre individuos como el intercambio de genes de resistencia entre bacterias. Lo que está claro es que este sistema de producción de ciertos tipos de animales destinados al consumo humano es idóneo para la diseminación de bacterias y de genes de resistencia entre los animales. Este hecho justifica que en los estudios que se realizan sobre microbiota intestinal de animales de cría intensiva, como es el caso de los pollos, el concepto de animal individual no existe, sino el de lote, por la gran facilidad de diseminación microbiana entre todos los individuos dentro del mismo lote.

El origen de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> parece encontrarse como se ha descrito anteriormente en genes cromosómicos de distintas especies de la bacteria ambiental *Kluyvera* que lograron ser movilizados y, posteriormente, incorporados en distintos elementos genéticos, lo que permite su diseminación en bacterias de distintos ecosistemas. Probablemente, la aparición de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> en *E. coli* o *Salmonella* es el fruto de diferentes eventos individuales y desconocemos en qué ecosistemas se produjo inicialmente, o si existieron bacterias intermediarias en este proceso de diseminación.

6.5. Vías de transmisión de Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas.

*¿Es posible la transferencia de bacterias portadoras de BLEE de animales al hombre?*

**La posibilidad de que la cadena alimentaria sea un vehículo** importante de transferencia de genes de resistencia al hombre ha sido planteada por distintos

autores (Wang *et al.*, 2006), y se ha sugerido un origen alimentario a la presencia de cepas de *E. coli* portadoras de BLEE en la microbiota intestinal de humanos (Prats *et al.*, 2003). En la misma línea, también se ha planteado el posible origen animal de cepas multirresistentes de *E. coli* implicadas en infecciones urinarias en clínica humana (Ramchandani *et al.*, 2005). *Salmonella* es un microorganismo que no forma parte de la microbiota intestinal de humanos y cuando se detecta esta bacteria en el hombre, está claro su origen animal. No obstante, se desconoce si la adquisición de genes codificantes de BLEE por *Salmonella* se ha producido en el entorno humano, animal o, posiblemente en ambos.

Estas bacterias pueden infectar a los animales o colonizar su intestino. La consecuencia natural de la colonización es la diseminación de estas bacterias resistentes de la granja al medio ambiente. En general, el ecosistema actúa como un depósito, un "resistome". Las bacterias resistentes que se puede encontrar en las heces, en el entorno de la granja (Goncalves *et al.*, 2010), los sistemas acuáticos plantas se pueden transferir de estas fuentes a los animales y a los seres humanos a través de la cadena alimentaria (Silbergeld *et al.*, 2008).

Fuerte evidencia apoyando el potencial de transmisión y colonización de *Enterobacteriaceae* entre los animales y el personal de la granja ha sido proporcionada por los informes de que los agricultores fueron colonizados con cepas indistinguibles de resistentes a los antimicrobianos de *E. coli* de animales destinados al consumo en la granja. Tal colonización fue reportado inicialmente por *E. coli* en aves y seres humanos (Levy *et al.*, 1976a, 1976b), y seguido por muchos informes posteriores sobre *E. coli* (Ojeniyi, 1989; Van den Bogaard *et al.*, 2001; Price *et al.*, 2007; Linton *et al.*, 1977).

También se ha reportado (Moodley y Guardabassi, 2009). (Dierikx *et al.*, 2010a) han demostrado que las personas que trabajan con aves de corral tienen un mayor riesgo de transporte intestinal de bacterias productoras de BLEE. La prevalencia de BLEE en los criadores de aves fue mayor. Igualmente hay evidencia reciente sobre el potencial zoonótico de *E. coli* patogénica extraintestinal (ExPEC) de origen animal y su posible transmisión directa o indirecta de los animales a los seres humanos, debido a la

posibilidad de que ExPEC que causan las infecciones urinarias y otras infecciones extraintestinales en los seres humanos puedan proceder de un depósito de alimentos de origen animal (Racicot *et al.*, 2012).

A partir de la revisión de la literatura científica, hemos podido comprobar que la microbiota intestinal de animales sanos destinados al consumo humano supone un reservorio de genes codificantes de  $\beta$ -lactamasas del tipo CTX-M (al menos, en Europa y en Asia). Estos genes, al estar localizados en estructuras genéticas con una alta capacidad de movilización, pueden ser fácilmente diseminados entre bacterias de diferentes ecosistemas, incluso en el entorno humano. Es probable que el uso de antibióticos en medicina humana esté contribuyendo a seleccionar bacterias portadoras de BLEE en la microbiota intestinal humana, pero también es muy posible que el importante reservorio de este tipo genes en la microbiota intestinal de los animales esté también favoreciendo la evolución creciente de *bla*<sub>CTX-M</sub> en el entorno humano. Nuevos estudios deberían realizarse en un futuro para analizar todos los factores que pueden estar contribuyendo a este aumento alarmante de bacterias portadoras de genes *bla*<sub>CTX-M</sub> en los diferentes ecosistemas con el objetivo de controlar, si es posible, la selección y diseminación de esta resistencia. Esto exigirá el trabajo conjunto y coordinado de profesionales implicados tanto en la sanidad humana como en veterinaria, para intentar abordar el problema desde una perspectiva integral.

## II.7.

### ***Métodos para la detección del Enterobacterias productoras de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido***

---

La identificación de Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido debe ser una prioridad en los laboratorios de microbiología clínica a fin de posibilitar un abordaje terapéutico adecuado, para lo cual existe una diversidad de opciones: métodos fenotípicos, genotípicos, presuntivos y confirmatorios, todos ellos con ventajas y desventajas (Sánchez 2004; Bauer *et al.*, 1966; Bertona *et al.*, 2005).

#### 7.1 Medios de cultivos

Para asegurar un rendimiento óptimo en la recuperación de enterobacterias productoras de BLEE a partir de frotis o exudados rectales y heces es necesario emplear medios selectivos, que eviten el crecimiento de la microbiota sensible. Hay descritos en la literatura diferentes medios selectivos de este tipo siendo los más habituales los que están suplementados con cefotaxima y ceftazidima. Los medios bases a los que se añaden estos antibióticos suelen ser agar MacConkey, agar de Driglasky o agar nutritivo con vancomicina y anfotericina B. También se ha comercializado recientemente un medio cromogénico (ESBL-Bx) que permite la identificación preliminar de las enterobacterias productoras de BLEE en 24 horas y que, en función de la coloración de las colonias, disminuye la necesidad de identificar algunos de los microorganismos que crecen en el medio. Entre ellos se encuentra el ChromID ESBL (bioMérieux), Brilliance ESBL agar (Oxoid) y el CHROMagar™ ESBL. Otro método cromogénico rápido es el Cica-beta-Test (Kanto Chemical). Se utiliza para la detección rápida de BLEE, directamente de la colonia de enterobacteria aislada.

Se han publicado estudios en los que las concentraciones de cefotaxima o ceftazidima empleadas han oscilado entre 0.5 y 4 mg/L aunque una concentración demasiado alta (4mg/L) podría determinar una menor sensibilidad en la detección. La elección del medio y del agente de selección debe tener en cuenta la situación epidemiológica de la unidad o el centro donde se lleve a cabo el estudio. Aunque las BLEEs hidrolizan con mayor o menor eficacia tanto cefotaxima como ceftazidima, debe tenerse en cuenta que algunas enzimas del grupo CTX-M hidrolizan muy poco este último. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

## 7.2 Métodos fenotípicos

Las técnicas para la detección fenotípica de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), se basan en la propiedad que presentan la mayor parte de estas enzimas de ser inhibidas por ácido clavulánico y en la utilización de cefalosporinas de tercera y cuarta generación y aztreonam como indicadores. La producción de BLEE se demuestra por la ampliación del halo de inhibición de cualquiera de los indicadores por la acción del ácido clavulánico.

El *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) recomienda como pruebas de tamizaje, para detección de BLEE el método de disco difusión en agar Mueller Hinton (Britania) mediante la técnica de Kirby y Baüer, donde podemos evidenciar la sensibilidad disminuida o resistencia a aztreonam (ATM) y a cefalosporinas de tercera generación, Cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ) y ceftriazona (CRO) que permiten sospechar la presencia de BLEE en *Escherichia coli* y *Klebsiella spp* y como **método confirmatorio BLEE - CLSI** (método americano), donde se emplea cefotaxima y ceftazidima con y sin ácido clavulánico, este último es un inhibidor de las BLEE (Famiglietti *et al.*, 2005; Clinical and Laboratory Standard Institute 2009). La potenciación de la actividad de la cefalosporina en presencia de ácido clavulánico indica la producción de BLEE. Una diferencia mayor o igual a 5 mm en los halos de inhibición entre los discos de CAZ-CLA y CAZ solos o CXT-CLA y CTX, fue interpretada como resultado positivo .

Por su parte, el **método de Jarlier** (Jarlier *et al.*, 1988), se basa en la sinergia entre los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (CAZ, CTX, CRO, ATM) colocados alrededor de un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10  $\mu$ g) (AMC), adicionalmente se ha determinado que el uso de cefalosporinas de cuarta generación como cefepime (FEP), facilita la detección de cepas BLEE con poca eficiencia hidrolítica (Famiglietti *et al.*, 2005; Oliver *et al.*, 2003; Drieux *et al.*, 2008). La presencia de BLEE se manifestó por el efecto sinérgico del inhibidor y los discos (efecto de huevo, cola de pez o balón de futbol americano).

Asimismo, el **método de Hodge**, usado para la determinación de mecanismos enzimáticos de resistencia, ha sido adaptado para identificar la presencia de  $\beta$ -lactamasas; dependiendo de los sustratos que se utilicen, son útiles para cualquier tipo de  $\beta$ -lactamasas (Hodge *et al.*, 1978). La presencia de la enzima se identificó al observar una deformación del halo de inhibición de la cepa de *E. coli* ATCC 25922 al disco con el sustrato en forma de hendidura. El **método tridimensional** descrito por Thomson *et al.*, es un bioensayo, basado en la determinación de mecanismos enzimáticos de resistencia presente en microorganismos capaces de hidrolizar un antibiótico determinado (Oliver *et al.*, 2003; Thomson *et al.*, 1992; Menon *et al.*, 2006). La presencia de la enzima se identificó al observar una hendidura en el halo de inhibición, producto del crecimiento de la cepa indicadora de *E. coli* ATCC 25922 hacia el disco empleado como sustrato.

La prueba de **E test ESBL** se fundamenta en el mismo principio que el de la prueba de discos combinados pero en este caso se comparan los valores de CMI. El E test ESBL presenta en un extremo un gradiente de concentración de cefotaxima, ceftazidima o cefepima y en el otro un gradiente de la cefalosporina con una concentración fija de ácido clavulánico.

También existen **sistemas automatizados** de antibiograma como Vitek® (BioMerieux), MicroScan (Dade Behring) y BD Phoenix (Becton Dickinson Biosciences) estos sistemas disponen en sus paneles/tarjetas comerciales de pocillos específicamente diseñados para el reconocimiento de enterobacterias productoras de BLEEs. En general se

obtienen buenos resultados con estos sistemas, que además suelen disponer de un sistema experto que alerta de la presencia de este mecanismo de resistencia.

### 7.3 Métodos moleculares

#### 7.3.1 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) a tiempo real.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una herramienta usada de rutina en todos los laboratorios de diagnóstico e investigación. La cuantificación de secuencias diana a través de PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) se basa en la detección y medición de los productos amplificados (amplicones) durante cada ciclo de la reacción de amplificación a diferencia de la PCR convencional, que la determinación y cuantificación de los amplicones se realiza a partir de productos acumulados al final de la PCR. Esto se logra a través de la determinación continua del aumento de la señal de fluorescencia durante la reacción, que es directamente proporcional a la cantidad de ADN presente en cada momento de reacción.

#### **Fundamento de la técnica PCR a tiempo real.**

La técnica de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real controla la cantidad de producto formado durante el curso de la reacción mediante el control de la fluorescencia de los tintes o sondas introducidos en la reacción que es proporcional a la cantidad de producto formado, y el número de ciclos de amplificación necesarios para obtener una cantidad de moléculas de ADN. Suponiendo una cierta eficiencia de amplificación, que normalmente se encuentra cerca de una duplicación del número de moléculas por ciclo de amplificación, es posible calcular el número de moléculas de ADN de la secuencia amplificada que estaban inicialmente presentes en la muestra. Con las técnicas altamente eficientes de detección, instrumentación sensible, y ensayos optimizados que están disponibles hoy en día el número de moléculas de ADN de una secuencia particular en una muestra compleja puede determinarse con precisión y la sensibilidad suficiente para detectar una sola molécula sin precedentes. Los usos típicos de PCR en tiempo real incluyen la detección de

patógenos, análisis de expresión de genes, análisis de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), el análisis de las aberraciones cromosómicas. Hay una amplia variedad de instrumentos para Real Time PCR, que consisten en una parte óptica y otra de termociclador para realizar la reacción, permiten detectar el número de productos amplificados generados en cada ciclo de la fase de amplificación logarítmica, por lo que esta técnica ha eliminado la necesidad de manipulación de la muestra que permite la automatización total de los sistemas de amplificación y detección, lo que minimiza los riesgos de contaminación (Arya *et al.*, 2005).

Se ha desarrollado un nuevo método de PCR en tiempo real para la detección rápida y determinación del genotipo de *bla*<sub>CTX-M</sub> de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. El método BLACTX-U G utiliza sondas marcadas con fluroforos que emiten fluorescencia en caso de amplificación. El ciclo de PCR en el que se detecta inicialmente un aumento significativo en la señal de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN/ARN presente en la muestra. Este valor se denomina Ciclo umbral (Ct-Cycle Treshold-o Cq –Cycle Quantificacion-).

La amplificación de CTX-M<sub>1</sub> se detecta en el canal correspondiente al fluoróforo FAM, la de CTXM<sub>2</sub> en el correspondiente al fluoróforo TxR, la de CTX-M<sub>9</sub> en el correspondiente al fluoróforo Alx647/Cy5 y el control interno en el correspondiente al fluoróforo Alx532/HEX.

## II.8.

### ***Métodos de tipificación molecular Enterobacterias productoras de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido***

---

#### 8.1 Tipificación molecular de microorganismos. Electroforesis en gel de Campos Pulsantes (PFGE)

Entre los métodos moleculares aplicados para *el Estudio Epidemiológico* se encuentra la tipificación molecular del ADN cromosómico mediante electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE). Las técnicas de macrorrestricción y PFGE se han utilizado para la tipificación molecular de un gran número de especies bacterianas. Son técnicas que exploran la organización del ADN cromosómico bacteriano bajo la acción de la digestión por un enzima, por tanto dan información general sobre el genotipo bacteriano y sus cambios más recientes. En general, sus resultados han demostrado ser suficientemente discriminativos, con excelente reproducibilidad y fáciles de interpretar cuando se estudian colecciones de microorganismos aisladas en un periodo de tiempo corto.

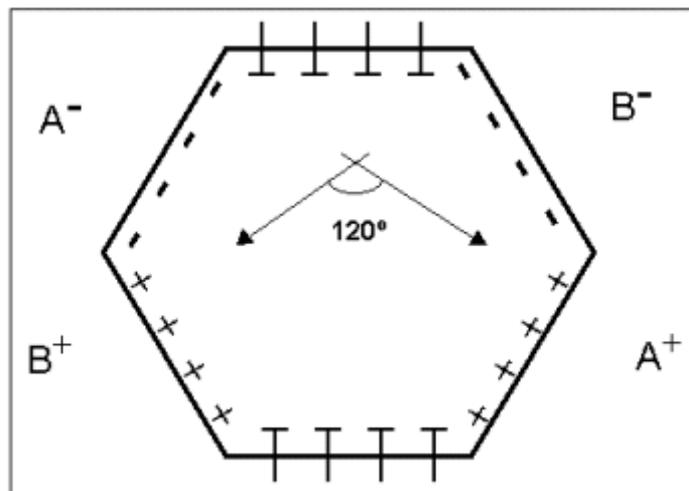
De la combinación de estas dos técnicas, macrorrestricción del ADN y separación de los fragmentos por PFGE, se obtienen , patrones de restricción sencillos que representan el ADN cromosómico bacteriano distribuido en unas pocas bandas con movilidades electroforéticas distintas.

#### **Fases en las que se divide el proceso de macrorrestricción y PFGE:**

1. El procedimiento de extracción de ADN, obliga a inmovilizar las células bacterianas en bloques de agarosa, en los que se llevará a cabo la lisis, de

- manera que el ADN cromosómico también quede embebido en agarosa, el objetivo es que el ADN permanezca íntegro y no se fracture accidentalmente lo cual desvirtuaría los patrones de restricción y afectaría a la reproducibilidad de la técnica.
2. La restricción del ADN debe hacerse utilizando enzimas de baja frecuencia de corte denominadas enzimas de restricción o endonucleasas de restricción. Son proteínas bacterianas que cortan en fragmentos de larga molécula lineal del ADN. Las enzimas de restricción son las principales herramientas de la tecnología del ADN recombinante. Una enzima de restricción reconoce una secuencia específica de nucleótidos, como AGCT, cortando el ADN en los lugares en donde esta combinación ocurra. Estas enzimas son aisladas de bacterias y designadas con una secuencia de tres o cuatro letras seguidas de un número romano.
  3. La técnica de electroforesis utilizada para la separación de fragmentos debe ser una PFGE, con las características diferenciales propias de ésta. De todos los sistemas desarrollados, el más extendido ha sido el CHEF (clamped homogeneous electric field electrophoresis). Sus mayores ventajas son la facilidad de manejo y la capacidad de separar múltiples muestras generando patrones de bandas rectos, que hacen mucho más fácil la comparación entre ellos. Este sistema dispone de veinticuatro electrodos dispuestos periféricamente y fijos a un contorno hexagonal. El voltaje generado por la fuente de electroforesis o generador de corriente se divide entre los electrodos, de manera que se crea un gradiente constante a lo largo de todo el gel. El ángulo de reorientación debe ser superior a  $90^\circ$ , habitualmente se trabaja con ángulos de  $120^\circ$  aunque existen modelos del sistema en el mercado que permiten modificar este parámetro. Por ángulo de reorientación, se entiende el ángulo que forman los vectores correspondientes a los dos campos eléctricos que se alternan y que refleja los grados de reorientación de una molécula de ADN para poder avanzar en la dirección de los campos eléctricos que se apliquen al gel. (Figura 26)

Figura 26.- Esquema de la distribución de electrodos en el sistema CHEF de electroforesis en campo pulsante. El ángulo señalado ( $120^\circ$ ) es el ángulo de reorientación entre el campo eléctrico A y B.



### Criterios para la interpretación de resultados

El Análisis de las imágenes obtenidas de acuerdo con los criterios de Tenover (Tenover *et al.*, 1995):

Para realizar la comparación, existen comercializados distintos software específicos, o en forma visual, en función del número de diferencias entre dos patrones clasificaremos a los aislamientos en:

- \* **Mismo número de bandas:** idénticos o *Indistinguibles*.
- \* **Diferencia de bandas es  $\leq 3$ :** *Estrechamente o Genéticamente relacionados*
- \* **Diferencia de bandas es  $\leq 6$ :** *Posiblemente relacionados*.
- \* **Diferencia de bandas es  $> 6$ :** *No relacionados epidemiológicamente*.

**Idénticos.** Cuando los dos aislamientos presentan el mismo número de bandas y éstas tienen aparentemente el mismo tamaño. En este caso ambos aislamientos representan la misma cepa.

**Genéticamente relacionados.** Cuando el número de diferencias entre los dos aislamientos sea inferior o igual a 3. Esto es debido a que un único cambio genético, en el más desfavorable de los casos (mutación espontánea que afecte a un lugar de restricción: creando uno nuevo o haciendo desaparecer uno ya existente), se traduce en un máximo de tres diferencias entre los patrones de un aislamiento y su ancestro. En este caso, las dos cepas pueden considerarse genéticamente relacionadas (una subtipo de la otra o ambas derivadas de un ancestro común) y sus diferencias pueden ser la consecuencia de los cambios genéticos que se acumulan en las sucesivas generaciones bacterianas.

**Posiblemente relacionados.** Cuando los cambios entre los dos patrones pueden ser atribuidos a dos hechos genéticos independientes, el número de cambios puede llegar a ser hasta de 6 (inserciones o deleciones de ADN; o ganancia o pérdida de lugares de restricción). Aunque estos aislamientos puedan también corresponder a una línea evolutiva común, su relación genética no es tan cercana y por tanto, es menos probable su relación epidemiológica. Este número de variaciones puede verse entre aislamientos separados por largos periodos de tiempo (> 6 meses), entre aislamientos que proceden de brotes que han afectado a un gran número de personas o entre aislamientos que proceden de situaciones endémicas prolongadas. En estos casos, antes de llegar a una conclusión sería interesante analizar las características fenotípicas de los aislamientos, su sensibilidad antibiótica y aplicar otros marcadores genotípicos si fuera necesario.

**No relacionados.** Cuando los cambios entre los dos patrones son atribuibles a tres o más cambios genéticos independientes, lo cual se traduce en un número de diferencias entre los dos patrones superior a 6. En este caso interpretaremos que las dos cepas pertenecen a clones distintas, sin relación epidemiológica.



### ***III. Material y Métodos***

En este apartado se expondrán los métodos empleados que permiten la caracterización de aislamientos de *Enterobacterias* productoras de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE), por métodos fenotípicos y moleculares en pollos procedentes de granjas de cebo en la Isla de Tenerife, España.

## 1. Introducción

Las granjas de cebo de pollos estudiadas, constan de instalaciones modernas, construcciones nuevas y seminuevas. Son naves cerradas, con ambiente controlado en cuanto a temperatura, humedad y ventilación (ventilador), con una capacidad entre 15.000 y 26.000 pollos. (Figura 27)

Figura 27. Granjas de explotación avícolas. Zona Sur de la Isla de Tenerife



Además disponen de dispositivos a fin de evitar en la medida de lo posible la entrada de posibles patógenos. Las naves se complementan con un almacén donde se guarda todo el material necesario. Las granjas visitadas cumplen con la

normativa vigente, el Real Decreto 692/2010, de 20 de mayo, Directiva 2007/43/CE, del consejo de 28 de junio, que establece las normas mínima para la protección de los pollos destinados a la producción de carne. Esta norma establece las condiciones que deben reunir las explotaciones de pollos (edificios, ventilación, iluminación, ruido), aspectos relativos a la alimentación, limpieza, registros, así como lo relativo al personal que trabaja.

Un total de diez granjas de explotación avícola representativas de la Zona Norte y Zona Sur de la Isla de Tenerife, fueron objeto de estudio. No se tiene conocimiento de que en ninguna de ellas se presentarán brotes infecciosos, ni tampoco información de la presencia de animales enfermos. De cada granja se tomaron 25 muestras de exudado rectal o contenido cloacal de pollos aparentemente sanos durante un período entre Noviembre 2012 y febrero 2013.

## 2. Toma y transporte de las muestras

---

### 2.1. Toma de la muestra

Siendo el aparato digestivo, el principal reservorio de enterobacterias productoras de BLEEs, las muestras de elección fueron exudado rectal o contenido cloacal. Se tomaron muestras correspondientes a 261 pollos vivos sanos, de forma aleatoria procedentes de las 10 granjas sometidas a estudio durante el período de Noviembre 2012 a Febrero de 2013. A la hora de recoger las muestras se tuvo en cuenta la edad del animal entre 26 a 45 días de edad.

Para la toma de la muestra se utiliza una escobillón estéril de rayón Amies-Rayon swabs (Deltalab™). Se introdujo la torunda 1 cm aproximadamente en la cloaca. Al finalizar la toma de la muestra, se introduce la torunda o escobillón en su contenedor correspondiente con el medio de transporte (Amies) y se etiqueta correctamente con los datos de interés. En todos los casos, la toma de la muestra

rectal fue realizada por personal veterinario experto, por lo que fue efectuada siempre de la misma manera y con los inconvenientes inherentes a este tipo de procedimientos en un animal vivo, como la resistencia ejercida por ellos.

## 2.2. Transporte y conservación de la muestra

No se precisan condiciones especiales de transporte y conservación para el cultivo de enterobacterias productoras de BLEE. Las muestras se procesan el mismo día de la toma en el laboratorio.

## 3. Aislamiento e identificación de *Enterobacterias* BLEE

Esta fase de aislamiento e identificación se basa en la detección de las diferentes Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido, mediante técnicas microbiológicas convencionales, a partir de cultivo de muestras rectales de pollos que nos permitirán estudios posteriores de tipificación molecular.

Una vez que tenemos la muestra en el laboratorio, se hace una siembra directa en medio de cultivo Agar chromID<sup>TM</sup> ESBL (BioMérieux®, Marcy l'étoile, France) previamente atemperadas. Incubar en estufa, a 37°C en aerobiosis. Los cultivos se examinan generalmente después de 18 a 24 horas de incubación. Este medio de cultivo permite la identificación directa de cepas mediante el desarrollo espontáneo de una coloración específica en las colonias de Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.

- *Escherichia coli*: coloración espontánea (rosa a burdeos) de las cepas productoras de  $\beta$ -glucuronidasa ( $\beta$ -GUR). Figura 28
- *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* (KESC): coloración espontánea verde a pardo verdosa o azul de las cepas que expresan una  $\beta$ -glucosidasa ( $\beta$ -GLU). Figura. 29



Figura 28.-Colonias *E. coli* BLEE en agar cromogénico



Figura 29.- Colonias *K. pneumoniae* BLEE en agar cromogénico

Para obtener un cultivo puro recomiendan la siembra de la colonia sospechosa en un medio de cultivo selectivo Mac Conkey agar. Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos gramnegativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos. Permite diferenciar bacterias que utilizan o no, lactosa. En bacilos fermentadores de la lactosa se observan colonias rosa a rojas, a veces rodeadas por un halo de sales biliares precipitadas. Figura 30



Figura 30. Crecimiento de *E. coli* en Mac Conkey agar

En caso de un resultado negativo, es posible realizar una prueba de oxidasa sobre las colonias incoloras o incubar el medio de cultivo 24 horas suplementarias, con el fin de optimizar la sensibilidad de detección del medio. Aunque la identificación de la especie o del grupo es directa, por recomendaciones de la casa comercial, el carácter *BLEE* debe confirmarse por una o varias pruebas complementarias

### 1. Test de Oxidasa:

#### Principio

Esta reacción se emplea para clasificar e identificar bacterias y se utiliza para diferenciar la familia *Pseudomonadaceae* de los miembros de *Enterobacteriaceae* que son oxidasa negativos. Para la detección de la enzima citocromo-oxidasa en microorganismos. La citocromo-oxidasa es una enzima del grupo de la porfirina férrica muy difundido en la naturaleza que oxida el citocromo C de la cadena transportadora de electrones. Para su detección se utiliza un compuesto orgánico que puede ser reducido por el sistema citocromo-oxidasa/citocromo C en presencia de oxígeno molecular, originando un producto coloreado fácilmente apreciable.



El test de oxidasa contiene el tetrametil-p-fenilendiamina, fijado en la almohadilla (zona de reacción) este compuesto va a ser oxidado por la citocromo C oxidasa con formación de la molécula de condensación, azul de indofenol, virando a purpura la zona de reacción mientras que en estado reducido es incolora.

#### Procedimiento y Lectura:

- Se toma con el asa de siembra una colonia sospechosa aislada en un agar en placas Plate count agar (PCA), que se ha incubado a  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  durante  $21 \pm 3$  horas y se pone en contacto con la zona de reacción de la tira reactiva que contiene tetrametil-p-fenilendiamina
- Si la enzima respiratoria citocromo-oxidasa está presente, este compuesto es oxidado con formación de azul de indofenol en 30 segundos.

- La lectura es inmediata, a través del cambio de color en la zona reactiva de la tira.
  - La reacción es positiva, la zona de reacción se colorea azul/violeta oscuro
  - La reacción es negativa, no se desarrolla color.

## 2. Test de Indol:

### Principio

Se utiliza para diferenciar la *E. coli* de otros coliformes. Se confirma la capacidad para producir Indol. El indol es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco y energía. El test de indol se basa en la formación de un complejo coloreado cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído. Este es el principio activo de los reactivos de Kovacs y Ehrlich.

### Procedimiento y lectura

- Coger la tira de Indol y dejar unos minutos hasta que alcance la temperatura ambiente.
- Escoger una colonia aislada y bien desarrollada del medio de cultivo, colocarla en el campo del test de la tira y extender con el asa de inoculación
- Añadir dos gotas de Reactivo de Indol (4-Dimetilaminocinamaldehído al 1% en ácido clorhídrico al 10%), sobre la zona reactiva.
- La lectura es inmediata, a través del cambio de color en la zona reactiva de la tira.
  - La reacción es positiva, la zona reactiva se colorea de azul-verdoso.
  - La reacción es negativa, No se desarrolla color.

## Resumen del procedimiento

1. La muestra se siembra en medio Agar chromoID™ ESBL (BioMérieux®, Marcy l'etoile, France) y se incuba a 37°C por 24h.
2. A las colonias sospechosas se le realiza el test de oxidasa y de indol para identificar la enterobacteria aislada.
3. Las colonias sospechosas se siembran en un medio de cultivo alternativo Mac Conkey agar para obtener un cultivo puro.
4. A partir del cultivo puro se resiembramos una colonia sospechosa de BLEE en agar sangre a 37°C por 24h, para la identificación y estudio de la sensibilidad bacteriana por el sistema automatizado Vitek 2® (bioMérieux).
5. Posterior a su confirmación se guarda la cepa pura aislada en medio de glicerol a - 20°C para su posterior estudio

## 4. Detección fenotípica de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

---

### 4.1 Prueba de difusión en disco

Se realiza la Prueba de **difusión en disco** empleando el Método de Jarlier (Comité de Sociedad Francesa de Microbiología (Jarlier, *et al.*, 1998).

Prueba de difusión en disco se trata de una técnica de sensibilidad semicuantitativa basada en los trabajos de Kirby y Bauer, que utiliza discos de papel impregnados de antibiótico a una concentración determinada que son depositados en una placa inoculada con una suspensión bacteriana 0.5 McFarland en suero fisiológico (equivalente a  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml). El diámetro del halo de inhibición de crecimiento (en mm) permite valorar la sensibilidad de un determinado microorganismo frente

a cada antibiótico siguiendo las normas establecidas por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

#### 4.1.1. Procedimiento

a) Se realizó la difusión en placas de cultivo de Mueller Hinton inoculadas con una suspensión de la cepa a estudiar de un cultivo de 18 a 24h en solución salina al 0.85% ajustada al patrón 0.5 de turbidez de la escala de McFarland.

b) Sobre ella se colocaron los discos de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg) en el centro de una placa a una distancia de 30 mm de otros discos de ceftazima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg) y aztreonam (30 µg). La separación óptima de los discos puede variar en función de la cepa.

c) Incubar a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 16-20 horas.

d) Examinar visualmente la apariencia de las zonas de inhibición. La interpretación de la prueba se realiza según el Método Jarlier (Comité de Sociedad Francesa de Microbiología (Jarlier, *et al.*, 1998).

- Positivo: Ampliación del halo de inhibición de cefotaxima, ceftazidima, cefepima o aztreonam en la zona próxima al disco con amoxicilina-ácido clavulánico (sinergia) o presencia de una "zona fantasma" (inhibición del crecimiento) entre las cefalosporinas o aztreonam y el inhibidor.
- Negativo: No ampliación de los halos de inhibición de cefotaxima, ceftazidima, cefepima o aztreonam ni presencia de "zona fantasma".

Figura 31.- La presencia de BLEE se manifestó por el efecto sinérgico del inhibidor y los discos-efecto de cola de pez



## 5. Estudio de la resistencia antimicrobiana

Para el estudio de la resistencia antimicrobiana de las cepas de *BLEE* aisladas, se utiliza el sistema *VITEK 2*<sup>®</sup> (*Biomerieux, Marcy l'étoile, France*).

El sistema *Vitek 2*<sup>®</sup>, es un sistema de identificación bacteriana y estudio de la sensibilidad bacteriana. La Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC) lo ha validado como método 992.19. El sistema utiliza una cámara incubadora con un lector óptico, una unidad de llenado/sellado para la inoculación del kit de la prueba y un ordenador. La identificación y sensibilidad de las bacterias se basa en la inoculación de una suspensión de microorganismos en tarjetas 30 pruebas bioquímicas con determinados paneles de reacción bioquímica contiene y tarjetas que contienen diluciones estandarizadas de distintos antibióticos correspondientes a los puntos de corte de sensibilidad respectivamente.

Para el estudio de la sensibilidad para bacilos gramnegativos se utiliza la tarjeta *AST-N243*. Estas tarjetas son específicas para el sistema *VITEK 2*<sup>®</sup> para la determinación in Vitro.

## Procedimiento

### a) Preparación del inóculo

- Para la preparación del inóculo se utilizan colonias bien aisladas de un cultivo puro en agar sangre en 24h.

Se realiza mediante la técnica de patrón de turbidez:

- Se toma un tubo de 5ml se le añade 3 ml de solución salina estéril al 0,85%, se toman 2 ó 3 colonias bien aisladas y se emulsionan en la solución salina.
- La turbidez final de la solución debe ser equivalente a 0.5 en la escala de turbidez de McFarland utilizando un densicheck.
- Programar la estación de trabajo
- Introducir el carrusel en la bandeja del equipo VITEK 2.
- Lectura de los resultados a las 18horas.

Tabla 10. -Los antibióticos a testar son los siguientes:

Grupo Farmacológico	Antibiótico	Abrev.
<b>Inh. B-lactamasas</b>	Amoxicilina/ac. clav Piperacilina/Tazobactam	AMC TZP
<b>B-lactámico</b>		
<b>Penicilina</b>	Ampicilina	AM
<b>Cefalosporina 2G</b>	Cefuroxima Cefuroxima Axetil	CXM CXMa
<b>Cefalosporina 3G</b>	Cefoxitina Cefotaxima ceftazidima	FOX CTX CAZ
<b>Cefalosporina 4G</b>	Cefepima	FEP
<b>Carbapenémicos</b>	Ertapenem Imipenem	EPM IPM
<b>Aminoglucósidos</b>	Amikacina Gentamicina	AN GM
<b>Quinolona</b>	Ac. Nalidixico	NA
<b>Fluoroquinolona</b>	Ciprofloxacina	CIP
<b>Glicilciclina</b>	Tigeciclina	TGC
<b>Cotrimoxazol</b>	Trimetropina/Sulfametoxazol	SXT

## 6. Estudio Moleculares.

### 6.1 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está basada en la amplificación de una región específica del ADN/ARN usando oligonucleótidos complementarios

*RealCycler BLACTX-U* es un kit de reactivos que permite la detección cualitativa por PCR a tiempo real del ADN de BLEE de los grupos CTX-M<sub>1</sub>, CTXM<sub>2</sub>, y CTXM<sub>9</sub> en muestras clínicas.

Tipos de *bla*<sub>CTX-M</sub> incluidos en cada grupo:

Grupo	Tipos de <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>
<b>Grupo CTX-M<sub>1</sub></b>	CTX-M <sub>1</sub> , CTX-M <sub>3</sub> , CTX-M <sub>10</sub> , CTX-M <sub>12</sub> , CTX-M <sub>15</sub> , y FEC <sub>1</sub> CTX-M <sub>22</sub> , CTX-M <sub>23</sub> , CTX-M <sub>28</sub>
<b>Grupo CTX-M<sub>2</sub></b>	CTX-M <sub>2</sub> , CTX-M <sub>4</sub> , CTX-M <sub>4L</sub> , CTX-M <sub>5</sub> , CTX-M <sub>6</sub> , CTX-M <sub>7</sub> , CTX-M <sub>20</sub> , y Toho <sub>1</sub>
<b>Grupo CTX-M<sub>9</sub></b>	CTX-M <sub>9</sub> , CTX-M <sub>13</sub> , CTX-M <sub>14</sub> , CTX-M <sub>16</sub> , CTX-M <sub>17</sub> , CTX-M <sub>19</sub> , CTX-M <sub>21</sub> , CTX-M <sub>27</sub> , Toho <sub>2</sub> y CTX-M <sub>24</sub>

### Descripción del método

El método BLACTX-U G utiliza sondas marcadas con fluoróforos que emiten fluorescencia en caso de amplificación. El ciclo de PCR en el que se detecta inicialmente un aumento significativo en la señal de fluorescencia es proporcional a

la cantidad de ADN/ARN presente en la muestra. Este valor se denomina Ciclo umbral (*Ct-Cycle Treshold*-o *Cq –Cycle Quantificacion-*).

La amplificación de CTX-M<sub>1</sub> se detecta en el canal correspondiente al fluoróforo FAM, la de CTXM<sub>2</sub> en el correspondiente al fluoróforo TxR, la de CTX-M<sub>9</sub> en el correspondiente al fluoróforo Alx647/Cy5 y el control interno en el correspondiente al fluoróforo Alx532/HEX.

### Procedimiento

- **Extracción y purificación de los ácidos nucleicos**

La extracción y purificación del Ácido desoxirribonucleico (ADN) se realizó de manera automatizada mediante el equipo Maxwell™, Madison, (USA). Este sistema automatizado procesa de 1 a 16 muestras en un tiempo de 45 minutos partiendo de la suspensión bacteriana.

### Procedimiento

- a) Se toman 2 a 3 colonias fresco de cultivo de menos de 24 horas y se resuspenden en suero fisiológico 0.9% (B-Braun™, España).
- b) Preparamos la solución de Lisis partir de 200 µl de buffer de lisis más 20 µl de proteinasa K.
- c) Se pipetea en un tubo de eppendorf 200 µl de muestra y 200 µl de solución de lisis mezclar bien.
- d) Pipeteamos el volumen total en el cartucho de extracción en la posición 1 , y en la última posición del cartucho la punta
- e) colocar en la gradilla los eppendorf de eluido con 50 µl de agua nuclease free.
- f) Se procede a poner en marcha el sistema.
- g) Transcurridos los 45 minutos obtenemos el ADN

- h) Conservar a temperatura de congelación (preferiblemente a -80°C) hasta su procesado.

### a) Protocolo PCR a tiempo real

Programar el protocolo de amplificación BLACTX-U de acuerdo con las siguientes especificaciones:

Tiempo	Temperatura	Ciclos	Fluorescencia
15:00	95°C	1	OFF
0:15	95°C		OFF
0:30	60°C	45	ON
0:30	72°C		OFF

Selección	Detecta
-FAM	CTX-M1
-TxR	CTXM-2
Alx647/Cy5	CTX-M9
Alx532/HEX	Control interno.

### b) Preparación de la reacción

b.1) Volumen de reacción de 25µl,

b.2) Equipo *SmartCycler*

Una vez obtenido el ADN mediante el protocolo automatizado de extracción Maxwrl II™ 16), ampliamos el gen CTX

- Descongelar la AmpliMix y el control Positivo
- Preparar los tubos de amplificación necesarios para muestras y controles
- Pipetear 17.8µl de AmpliMix en cada tubo de amplificación.
- Añadir 7.2 µl del ADN de cada muestra o control a cada tubo.
- Colocar los tubos en el equipo
- Seleccionar el protocolo “BLACTX”
- Iniciar el programa de amplificación.

### c) Interpretación de los resultados

Se interpretó el resultado obtenido en cada muestra según la combinación de señales indicadas en la siguiente tabla de datos proporcionada.

Canales				Interpretación
FAM	TxR	Alx647/Cy5	Alx532/Hex	
Positivo	Negativo	Negativo	Indiferente	Positivo CTX-M <sub>1</sub>
Negativo	Positivo	Negativo	Indiferente	Positivo CTX-M <sub>2</sub>
Negativo	Negativo	Positivo	Indiferente	Positivo CTX-M <sub>9</sub>
Positivo	Positivo	Negativo	Indiferente	Positivo CTX-M <sub>1</sub> CTX-M <sub>2</sub>
Positivo	Negativo	Positivo	Indiferente	Positivo CTX-M <sub>1</sub> y CTX-M <sub>9</sub>
Negativo	Positivo	Positivo	Indiferente	Positivo CTX-M <sub>2</sub> y CTX-M <sub>9</sub>
Positivo	Positivo	Positivo	Indiferente	Positivo CTX-M <sub>1</sub> , CTX-M <sub>2</sub> y CTX-M <sub>9</sub>
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	No se detecta
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No valorable

## 7. Tipificación molecular. Electroforesis de campos pulsantes (PFGE)

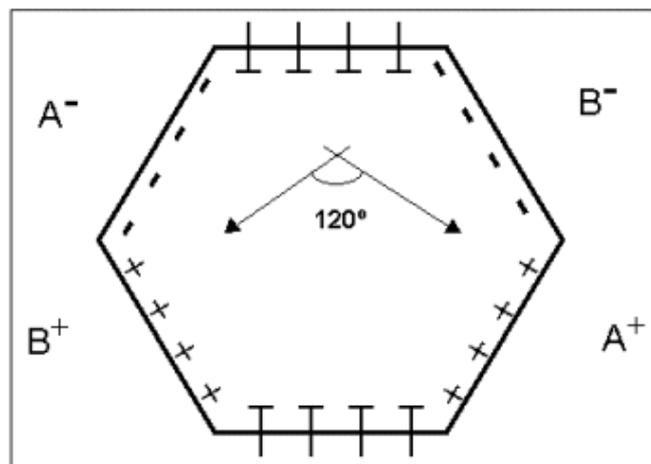
La tipificación molecular del ADN cromosómico mediante electroforesis de campo pulsante (PFGE), para *el Estudio Epidemiológico*, nos permite determinar la relación clonal que existe entre diversas cepas aisladas de la misma especie.

### Sistema PFGE CHEF-MAPPER (Clamped Homogeneous Electric Field Electrophoresis)

- Metodología

Mediante esta técnica separamos fragmentos de ADN cromosómicos de elevado tamaño en patrones sencillos de 10 a 20 bandas, lo cual facilita la comparación de unos con otros permitiendo establecer grados de similitud genérica entre las cepas bacterianas estudiadas, mediante una técnica especial de electroforesis en la que se aplican campos eléctricos de incidencia pulsante. Este sistema dispone de veinticuatro electrodos dispuestos periféricamente y fijos a un contorno hexagonal. (Figura 32)

Figura 32. Esquema de la distribución de electrodos en el sistema CHEF de electroforesis en campo pulsante. El ángulo señalado ( $120^\circ$ ) es el ángulo de reorientación entre el campo eléctrico A y B.



**Fases:**

- a) Extracción de ADN bacteriano
- b) Restricción del ADN utilizando enzimas de restricción de baja frecuencia de corte
- c) Separación de los fragmentos obtenidos mediante PFGE.

**a) Extracción del ADN cromosómico**

1. Descongelar la cepa y pasar a agar Sangre COS. Incubar 37°C por 24h
2. Rotular tantos tubos como muestras a estudiar que contengan 15 ml de caldo LB y añadir con un asa de 7 a 8 colonias aisladas del cultivo en agar sangre e incubar a 37°C por 24h.
3. Medir la absorbancia a 540nm. Dependiendo de la Densidad óptica obtenida tomaremos una cantidad determinada del caldo y lo transferimos a un tubo de pico de 15ml.

$$OD_{540nm} = 0.6 \text{ a } 0.7 = 10\text{ml de caldo}$$

$$OD_{540nm} = 1.3 = 7\text{ml de caldo}$$

$$OD_{540nm} = > .5 = 1.5\text{ml de caldo}$$

4. Centrifugar 10 minutos a 3.000 rpm
5. Se decanta el sobrenadante y resuspender en 4-5ml PET IV y agitar en el vortex.
6. Centrifugar 10 minutos a 3.000 rpm
7. Se decanta el sobrenadante y resuspender en 1 ml PET IV y agitar en el vortex.
8. Limpiar los moldes de los insertos con agua y etanol, dejar secar
9. Sellar los moldes por la parte inferior con cinta adhesiva
10. Preparar la cantidad necesaria de agarosa de bajo punto de fusión al 1.6% (20ml de agua más 0.320g de agarosa, hervir 3 veces en el microonda).

11. Dispensar 300ul de agarosa en tubos de eppendorf y mantenerla en un bloque térmico a 55°C.
12. Mezclar 300 µl de la suspensión con 300 µl de la solución de agarosa fundida
13. Rellenar los moldes y dejar solidificar la mezcla en nevera durante 40 a 50 min (no más de 1h).

- Lisis

1. Cuando ya se hayan solidificado los insertos, se retira la cinta adhesiva y se extraen del molde con la ayuda de una pera de goma. Presionando con la pera en la parte superior del molde.
2. Se transfieren los insertos directamente a un tubo debidamente rotulado con:

**2ml de tampón de lisis I, 20µl de Lisozima y 4 µl de RNAsa.**

3. Incubar a 37°C por 24h.
4. Decantar el tampón lisis I y añadir **2ml de tampón lisis II y 10µl de proteinasa K.**
5. Incubar a 50-55°C por 48h.

- Lavados

1. Transferir 1 inserto a un tubo de 15 ml con aproximadamente 10 ml de solución tampón TE (10mM Tris HCl (ph 8); 0.1mM EDTA) y guardar en nevera a 3 - 4°C por 24 h.
2. Decantar y cambiar la solución tampón TE 2 veces más (2 a 4ml) y se mantiene a 3 – 4°C hasta la macrorestricción por 24h.

**b) Digestión del ADN con enzimas de restricción (Macrorrestriccion)**

1. Se enumeran los eppendorf o tubos de micro centrífuga que se van a utilizar. Con la ayuda de 2 cubre objetos se corta menos de la cuarta parte del inserto y se deposita una porción de un tamaño similar de cada uno, en el eppendorf correspondiente.
2. Se le añade 168  $\mu$ l de la a solución de restricción en cada uno e incubar 37°C durante 18 h en un termobloque.

Solución de Restricción	
H <sub>2</sub> O estéril	143 $\mu$ l
Tampón específico <i>Xba</i> I® (Buffer D 10x, Promega, Madison WI, USA).	20 $\mu$ l
BSA® (concentración 10mg/ml) (Promega, Madison WI, USA).	2 $\mu$ l
Enzima <i>Xba</i> I, GQ 10u/ $\mu$ l® (Promega, Madison WI, USA).	3 $\mu$ l

La enzima de restricción que utilizamos en nuestro estudio fue ***Xba*I** (MBI Fermentas). Por ser recomendada por diversos autores para la caracterización molecular mediante la técnica de PFGE para bacterias Gram negativas (Kariuki *et al.*, 1999b; Garaizar *et al.*, 2000; Liébana *et al.*, 2001; Iguchi *et al.*, 2002; Kawano *et al.*, 2006).

### c) Electroforesis en Campo pulsantes (PFGE)

- Preparación del gel de agarosa al 1%

Se utilizó agarosa ncuyas características (“high gel strenght”, alta movilidad electroforética, “higher exclusión limit”) posibilitan una separación óptima de fragmentos de ADN de gran tamaño por electroforesis de campo pulsado, ya que su bajo valor de electroendosmosis (<0.05) permite una mayor movilidad electroforética, y son adecuadas para la posterior trasfereencia de ADN a membranas específicas.

1. Preparar 100ml de un gel agarosa<sup>®</sup> al 1% en TBE 0.5x.  
(100 ml de TBE 0.5x se le añade 1 g de agarosa) Mezclar y dejar hervir 3 veces en el microondas.
2. Dejar enfriar la solución en agitación durante 30 min.
3. Preparar el molde encajando la bandeja en el soporte.
4. Seleccionar el peine correspondiente a 15 pocillos y colocar consecutivamente en cada uno de los dientes el inserto digerido correspondiente siguiendo el orden establecido al inicio del proceso de restricción.
5. Verter cuidadosamente la agarosa (que está a una temperatura no superior a 50°C y no inferior a 45°C) evitando que esta arrastre algunos de los insertos y esperar 30 min a que la agarosa se solidifique.
6. Colocar por cada gel o campo 3 pesos moleculares (dos en las calles de los extremos y uno en la calle central).

### Colocación en el sistema

#### Equipo CHEF-MAPPER

1. Preparar 3 L de tampón de electroforesis TBE 0.5x (300 ml de TBE 5x 2n 2700 ml de agua destilada mili Q<sup>®</sup>). Verter en la cubeta de electroforesis 2L aproximadamente de este Buffer, se conecta un sistema de recirculación y refrigeración del tampón.
2. Se programa las condiciones de electroforesis en el equipo de acuerdo a los siguientes parámetros:  
Controlador de pulsos:  
Voltaje de 6V/cm, 24 horas, pulso inicial 1 segundo, pulso final 30 segundos y debe ajustarse la temperatura a 12 °C.

3. Una vez que se alcanza la temperatura deseada, desmontar el molde que contiene el gel, depositarlo sujeto a la bandeja en la cubeta de PFGE en el marco adecuado, y cerrar la tapa.
4. Poner en marcha el Sistema.

#### Extracción del gel y tinción

1. Una vez finalizado los ciclos del PFGE.
2. Abrir la tapa de la cubeta y extraer el gel y sumergirlo en la solución de tinción (500ml de TBE 0.5x y 25  $\mu$ l de Bromuro de etidio) durante 20 min en agitación suave a temperatura ambiente.
3. Visualizar el gel en el trasluminador Gel Logic 200<sup>®</sup> de Luz Ultravioleta y se fotografía, para la lectura e interpretación de los resultados.

#### Análisis de las imágenes obtenidas

El término de análisis de imágenes hace referencia a la comparación de dos o más patrones de bandas correspondientes a las distintas cepas aisladas. El procedimiento de comparación se realizó a través del examen visual para el conteo de bandas en función de los criterios de Tenover. Esta clasificación de la relación genética entre microorganismos, pretende ser sólo orientativa.

#### Análisis de los patrones de restricción de ADN

Los patrones de bandas de PFGE, fueron clasificados de acuerdo con los criterios de Tenover(Tenover *et al.*, 1995)

En función del número de diferencias entre dos patrones clasificaremos a los aislamientos en:

- \* **Mismo número de bandas:** idénticos o *Indistinguibles*.
- \* **Diferencia de bandas es  $\leq 3$ :** *Estrechamente o Genéticamente relacionados*

- \* **Diferencia de bandas es  $\leq 6$ :** *Posiblemente relacionados.*
- \* **Diferencia de bandas es  $> 6$ :** *No relacionados epidemiológicamente.*

**Idénticos.** Cuando los dos aislamientos presentan el mismo número de bandas y éstas tienen aparentemente el mismo tamaño. En este caso ambos aislamientos representan la misma cepa.

**Genéticamente relacionados.** Cuando el número de diferencias entre los dos aislamientos sea inferior o igual a 3. Esto es debido a que un único cambio genético, en el más desfavorable de los casos (mutación espontánea que afecte a un lugar de restricción: creando uno nuevo o haciendo desaparecer uno ya existente), se traduce en un máximo de tres diferencias entre los patrones de un aislamiento y su ancestro. En este caso, las dos cepas pueden considerarse genéticamente relacionadas (una subtipo de la otra o ambas derivadas de un ancestro común) y sus diferencias pueden ser la consecuencia de los cambios genéticos que se acumulan en las sucesivas generaciones bacterianas.

**Posiblemente relacionados.** Cuando los cambios entre los dos patrones pueden ser atribuidos a dos hechos genéticos independientes, el número de cambios puede llegar a ser hasta de 6 (inserciones o deleciones de ADN; o ganancia o pérdida de lugares de restricción). Aunque estos aislamientos puedan también corresponder a una línea evolutiva común, su relación genética no es tan cercana y por tanto, es menos probable su relación epidemiológica. Este número de variaciones puede verse entre aislamientos separados por largos periodos de tiempo ( $> 6$  meses), entre aislamientos que proceden de brotes que han afectado a un gran número de personas o entre aislamientos que proceden de situaciones endémicas prolongadas. En estos casos, antes de llegar a una conclusión sería interesante analizar las características fenotípicas de los aislamientos, su sensibilidad antibiótica y aplicar otros marcadores genotípicos si fuera necesario.

**No relacionados.** Cuando los cambios entre los dos patrones son atribuibles a tres o más cambios genéticos independientes, lo cual se traduce en un número de

diferencias entre los dos patrones superior a 6. En este caso interpretaremos que las dos cepas pertenecen a clones distintas, sin relación epidemiológica.

## 8. Materiales

---

### **Medios de cultivo, reactivos y materiales.**

- Medios cromogénicos para screening de organismos multirresistentes. Agar chromID™ ESBL (BioMérieux®, Marcy l'étoile, France).
- Medio de cultivo Mac Conkey, agar (BioMérieux®, Marcy l'étoile, France).
- Medio de cultivo Mueller Hinton agar (BioMérieux®, Marcy l'étoile, France).
- Discos de antibióticos: cefotaxima CTX (30ug), ceftazidima CAZ (30g), Aztreonam ATM (30ug)), cefuroxima CXM (30ug), Amoxicilina/ ácido clavulánico AMC (20/10ug). Oxoid.
- Reactivo de oxidasa (Strips BioChemika, for microbiology, Fluka).
- Reactivo de Indol (Cultimed).
- Tarjetas de sensibilidad AST-N243 para determinar la sensibilidad in vitro de bacilos gramnegativos por el sistema VITEK 2® (Biomérieux, Marcy l'étoile, France).
- Enzima *Xba*I, GQ 10u/μl® (Promega, Madison WI, USA).
- PCR a tiempo real utilizando el equipo SmartCycler® (Cepheid®).
- Kit de *RealCycler* BLACTX. Progenie Molecular.
- Pipetas estériles de volumen variable.

- Escobillón estéril de rayón Amies-Rayon swabs (Deltalab).
- Autoclave, estufa de 35 a 37°C, balanza, agitador vortex, mechero, asas de plástico estériles desechables, escobillones estériles, densitómetro, nevera a una temperatura de 4°C, congelador a una temperatura de -22°C.
- Tubos de suero fisiológico (0.85 g de NaCl en 100 ml de agua destilada estéril)

## 9. Soluciones necesarias para el Ensayo

---

### 1. PET IV:

Para 500 ml

- 5ml Tris base 1M (10mM Tris pH 7.6)
- 29.2g NaCl (1M NaCl)
- Completa con agua destilada
- Autoclavar
- Conservar a 2 a 4°C

### 2. Tampón Lisis I:

Para 100ml

- 600µl Tris-HCl pH 7.6 (6mM tris-HCl (pH 7.5))
- 2 ml NaCl 4M (1M NaCl)
- 20ml EDTA 0.5M pH 7.6 (100mM EDTA pH 7.5)
- 41.9ml Agua destilada
- Autoclavar

Añadir

- 5ml Desoxicolato 4% (0.2% Desoxicolato sódico)
- 2.5ml Sarcosil 20% (0.5% Sarcosilato SLS)
- 5ml Brij 1% (0.5% Brij 58)
- Conservar a 2 a 4°C

### 3. Tampón Lisis II

Para 100ml

- 18.6g EDTA (0.5M EDTA pH 9-9.5)
- 80ml agua destilada
- Ajustar el pH (9-9.5) añadiendo 22 lentejas de NaOH aproximadamente.
- Autoclavar

Añadir

- 5ml Sarcosil 20% (1% Sarcosil)
- Conservar a 2 a 4°C

**4. TE**

Para 500 ml

- 5ml Tris base 1M pH 7.6 (10mM Tris-HCl)
- 20µl EDTA 0.5M pH 8 (0.11mM EDTA pH 8)
- 495ml agua destilada
- Autoclavar
- Conservar a 2 a 4°C.

**5. TBE (5x)**

Para 500 ml

- 27g Tris base (1M Tris pH 7.5)
- 1.85g EDTA (2mM EDTA pH 8)
- 360ml agua destilada

Mezclar bien y añadir

- 13.75g Ácido Bórico (1M Ácido Bórico)
- 140 ml agua destilada
- Autoclavar
- Conservar a temperatura ambiente

**6. Medio de cultivo Luria Bertani (Caldo LB)**

Para 500ml

- 5g tryptona
- 2.5g de extracto levadura
- 5g cloruro sódico
- Disponer 15ml en tubos de cristal con tapón
- Autoclavar
- Conservar en nevera a 4°C

## **Anexos**

### **Bromuro de etidio 1%.**

Añadir 10µl de Bromuro de etidio en 990µl agua destilada en un frasco color ámbar y mantener a 2-4°C en oscuridad para evitar la fotoinactivación

**Brij-58.** Solución al 10% en agua destilada. Conservar a temperatura ambiente.

### **Desoxicolato 4%**

Para 50ml

- 2g de desoxicolato de sodio
- 50ml agua destilada
- Conservar a temperatura ambiente (TA)

### **EDTA 0.5M**

- 18.6g EDTA
- 100ml agua destilada
- Añadir 10-12 lentejas de NaOH para justar el pH 8
- Conservar a TA

### **NaCl 4M**

- 23.3g NaCl
- 100ml agua destilada
- Autoclavar
- Conservar a TA

### **Sarcosyl 20%**

Para 100ml

- 20g N-Lauroylsarcosine
- 100ml agua destilada
- Conservar a TA

### **Tris base 1M**

Para 100ml

- 12g Trizma
- 75ml agua destilada
- Añadir HCl usar guantes y mascarilla hasta ajustar pH 7.6
- Completar con agua destilada hasta 100ml
- Conservar a TA.

**Lisozima**

Solución de 100mg/ml en agua destilada. Se reparte en alícuotas de 300µl en tubos tipo eppendorf y conservar a temperatura de congelación -20°C

**Proteína K**

Solución de 10mg/ml en agua destilada. Se reparte en alícuotas de 500µl y conservar a temperaturas de congelación -20°C.

**RNasa-A**

Solución de 10mg/ml en agua destilada. Debe hervirse durante 5 min antes de repartir y se reparte en alícuotas de 600µl en tubos tipo eppendorf y conservar a temperaturas de congelación -20°C



## ***IV. Resultados***

## IV.1.

***Prevalencia de Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE) en muestras de pollos sanos***

En la tabla 11, se muestran el número de aislamiento de cepas de *Enterobacterias* BLEE en las 261 muestras rectales de pollos procedentes de 10 granjas avícolas en la Isla de Tenerife-España.

El porcentaje de positividad de las muestras de pollos por *Enterobacterias* BLEE fue del 90.8%

**Tabla 11.-** Aislamiento de *Enterobacterias* BLEE en muestras rectales de pollos

Nº Muestras	Positivas BLEEs	Negativas BLEEs	% de Positividad
261	237	24	90.8

En la tabla 12, se muestran el número de aislamiento y porcentaje de cepas de las diferentes especies de *Enterobacterias* BLEE aisladas en 261 muestras rectales de pollos testadas. En nuestro estudio aislamos en un porcentaje muy elevado a la especie *E. coli* (90,8%) y en un porcentaje muy inferior a la especie *Klebsiella pneumoniae* (1.1%). No se aisló ninguna otra especie de enterobacterias en nuestro estudio.

**Tabla 12.-** Aislamiento de especies de *Enterobacterias* BLEE en muestras rectales de pollos

Especies de Enterobacterias	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Nº cepas productoras de BLEE	<b>237</b>	<b>3</b>
Porcentaje	<b>90,8</b>	<b>1.1</b>

En la tabla 13, se muestra el número de aislamiento de cepas de *Escherichia coli* productora de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido en muestras rectales de pollos según la granja de procedencia. En la tabla se observa que el porcentaje de positividad oscila entre el 100% al 72%.

**Tabla 13.-** Aislamiento de *E. coli* BLEE en muestras rectales de pollos, distribuidas por granja

Granja	Nº Muestras	<i>E. coli</i> BLEE	% Positividad
1	25	22	<b>88</b>
2	25	19	<b>76</b>
3	25	18	<b>72</b>
4	27	27	<b>100</b>
5	26	19	<b>73</b>
6	27	27	<b>100</b>
7	27	0	<b>100</b>
8	26	0	<b>100</b>
9	25	1	<b>96</b>
10	27	0	<b>100</b>

En la tabla 14, se refleja el número de aislamiento de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en muestras rectales de pollos de las 10 granjas estudiadas. En la tabla se observa la baja prevalencia de *K. pneumoniae* BLEE, solo se aisló en 3 pollos de 2 granjas diferentes. En ambos casos fueron aislamientos mixtos junto con *E. coli* BLEE.

**Tabla 14.-** Aislamiento de *K. pneumoniae* BLEE en muestras rectales de pollos, distribuidas por granja

Granja	Nº Muestras	<i>K. pneumoniae</i> BLEE	% Positividad
1	25	0	<b>0</b>
2	25	0	<b>0</b>
3	25	0	<b>0</b>
4	27	0	<b>0</b>
5	26	0	<b>0</b>
6	27	0	<b>0</b>
7	27	2	<b>8.0</b>
8	26	0	<b>0</b>
9	25	0	<b>0</b>
10	27	1	<b>3.7</b>

## IV.2.

### ***Estudio del genotipado de cepas de E. coli BLEE procedentes de pollos sanos***

---

Todas las cepas aisladas en este estudio fueron caracterizadas mediante la técnica de electroforesis en gel por campos pulsantes (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE), utilizando la endonucleasa de restricción *Xba*I, GQ 10u/μl® (Promega, Madison WI, USA) y el sistema CHEF MAPPER PFGE (Bio-Rad)®. Las condiciones fueron las siguientes: 14 °C, un voltaje 6 V/cm, pulso inicial 1 segundo y pulso final 30 segundo, y 24 horas. (Fernández-Baca et al., 2001) 6 V / cm, el pulso de 1 a 30 s, y 24 horas (Fernández-Baca et al., 2001). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y fotografiados bajo luz UV. El procedimiento de comparación se realizó a través del examen visual para el conteo de bandas en cepas tipables en función de los criterios de Tenover.

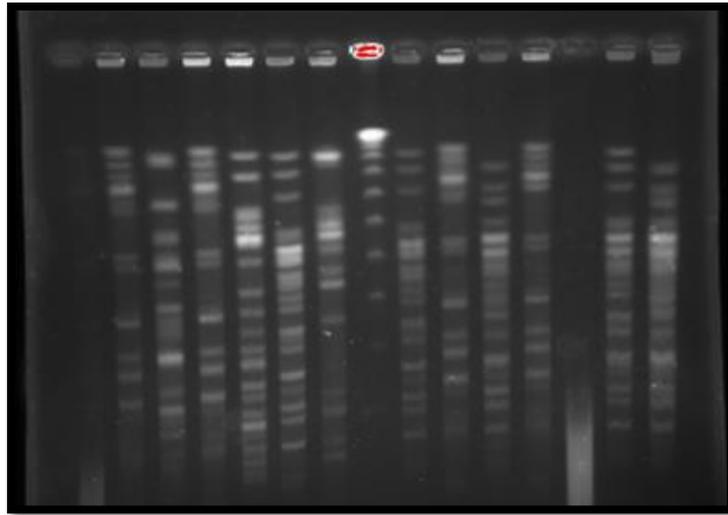
En nuestro estudio, de los 237 aislamientos de *E. coli* BLEE con la enzima de restricción, *Xba*I pudieron tipificarse 196. También se obtuvieron 41 cepas autolíticas consideradas como no tipables (NT).

Esta enzima de restricción utilizada fue seleccionada ya que, según estudios previos, es la más adecuada para la caracterización de Enterobacterias, al producir bandas claras y bien separadas y ser los patrones fácilmente interpretables. (Kariuki et al., 1999b; Garaizar et al., 2000; Liébana et al., 2001; Iguchi et al., 2002; Kawano et al., 2006).

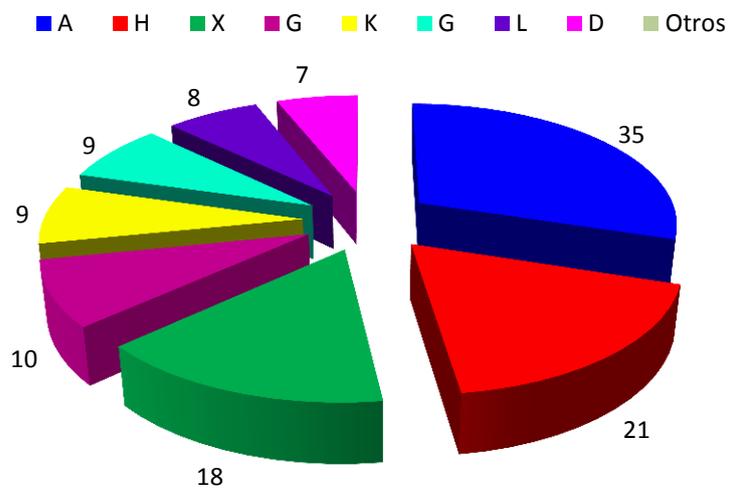
1.- En el análisis por electroforesis en gel por campos pulsantes (pulsed-field gel se obtuvieron 44 patrones de bandas de diferentes. La relación clonal de las cepas establecida por Electroforesis en gel de Campos Pulsantes (PFGE) del total de aislados de *E. coli* BLEE en este estudio, evidenció una gran variabilidad genética dentro de los

aislados. En las imagen 1, se refleja la variabilidad genética presentada por este microorganismo.

**Imagen 1.-** Macrorrestricción con *Xba*I y posterior PFGE. Peso molecular: carril 8. *E. coli* BLEE: carriles 1-7 y 9-15.

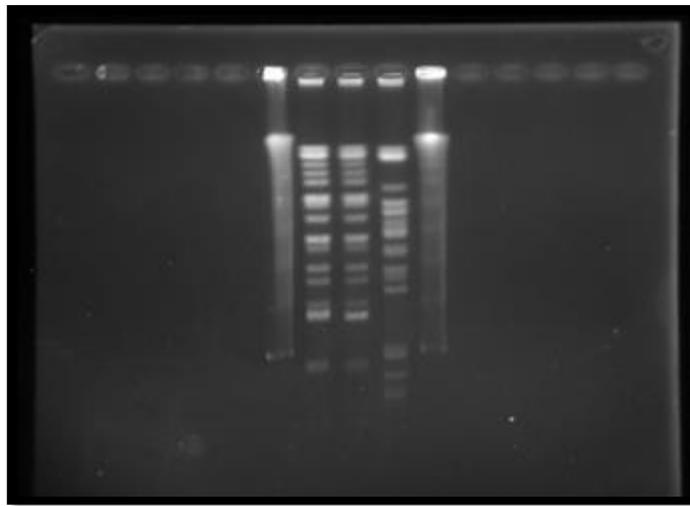


**Figura 33.-** Distribución de los distintos patrones de bandas más frecuentes obtenidos en gel de campos pulsantes con la enzima de macrorrestricción *Xba*I en cepas de *E. coli* BLEE.



2.- En el análisis por electroforesis en gel por campos pulsantes (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) de un total de 3 aislados de *Klebsiella pneumoniae* BLEE, con la enzima de restricción *Xba*I (Promega)<sup>®</sup> y el sistema CHEF MAPPER PFGE (Bio-Rad)<sup>®</sup> se obtuvieron 2 patrones de bandas de diferentes según los criterios de Tenover. Imagen 2.

**Imagen 2.-** Macrorrestricción con *Xba*I y posterior PFGE. Peso molecular: carril 6-9. *K. Pneumoniae* BLEE: carriles 8- 9.



### IV.3

#### **Caracterización de Enterobacterias productora de $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE) en muestras de pollos sanos**

---

#### 3.1 Estudio Moleculares.

##### 3.1.1. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real

En nuestro estudio realizamos la caracterización de las cepas de *E. coli* que portaban el gen CTX-M utilizando la técnica *RealCycler* BLACTX, que permite la detección cualitativa por PCR a tiempo real del ADN de BLEE de los grupos filogenéticos CTX-M<sub>1</sub>, CTXM<sub>2</sub>, y CTXM<sub>9</sub>, por ser los de mayor frecuencia.

En la Tabla 15, aparecen reflejadas el grupo filogenético de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido CTX-M determinadas en los 196 aislados de *E. coli* productor de BLEE de nuestro estudio mediante técnica de PCR.

**Tabla 15.** - Porcentaje de prevalencia de grupos filogenéticos de  $\beta$ -lactamasas CTX-M

Grupo <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	Nº	%
<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	<b>87</b>	<b>44,4</b>
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	<b>18</b>	<b>9,2</b>
<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	<b>13</b>	<b>6,0</b>
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1 y CTX-M-2</sub>	<b>2</b>	<b>1,0</b>
<b>Otros grupos de <math>\beta</math>-lactamasas</b>	<b>76</b>	<b>39,0</b>
<b>Total</b>	<b>196</b>	<b>100</b>

De la caracterización genética de las BLEE se obtuvo que de las 196 cepas de *E. coli*, 87 (44,4%), presentaron BLEE tipo CTX-M<sub>9</sub>; 18 (9,2%), tipo CTX-M<sub>1</sub>; 13 (6,0%), tipo CTX-M<sub>2</sub> y 78 cepas presentaron otros grupos de BLEE no caracterizadas.

Figura 34.- Distribución de cepas de *Escherichia coli* de origen aviar en función de las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) que albergan

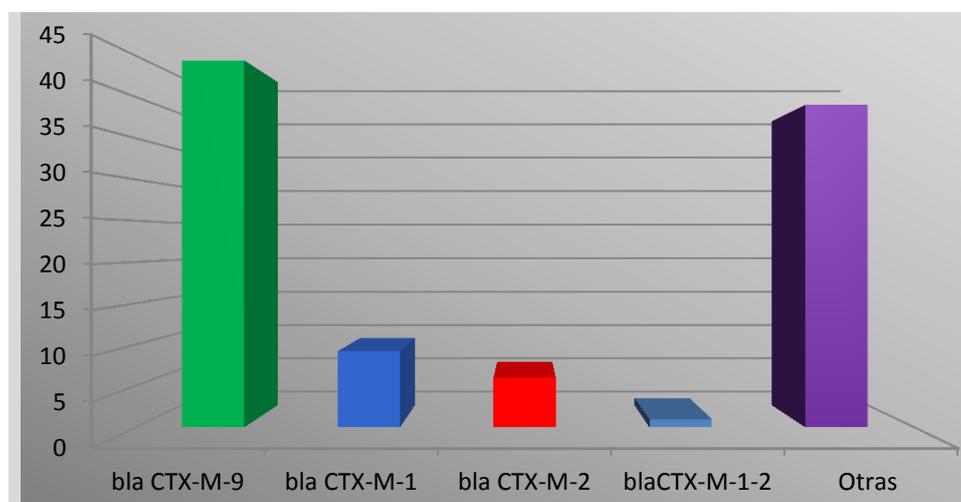


Tabla 16.- Porcentaje de prevalencia de grupos filogenéticos de las *K. pneumoniae*  $\beta$ -lactamasas CTX-M

Grupo <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	Nº	%
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	1	33,3
Otros	2	66,7
<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>100</b>

De la caracterización genética de las 3 cepas de *Klebsiella pneumoniae* BLEE se obtuvo que 1(33.3%), presento BLEE tipo CTX-M-1 y 2 presentaron otros grupos de enzimas  $\beta$ -lactamasas no caracterizadas

Se observa en los datos obtenidos que el número de  $\beta$ -lactamasas producidas por cada uno de los aislados fue variable, encontrándose en algunos casos la producción simultánea de dos o más enzimas, como se observa en los datos obtenidos: producción de una enzima 118 aislados (60.2%), dos enzimas en 2 aislado (%)

#### IV.4

### **Resistencia antibiótica de cepas de *Enterobacterias BLEE* procedentes de pollos sanos**

#### 4.1 Resistencia antibiótica

##### 4.1.1 Resistencia antibiótica de cepas de *Escherichia coli* BLEE aislados BLEE

En la Tabla 17, se observa el porcentaje de resistencia del total de cepas de *E. coli* BLEE a los antibióticos ensayados. Las mayores resistencias, sin considerar a los  $\beta$ -lactámicos no carbapenémicos, aparecen en las quinolonas (ácido nalidixico y ciprofloxacina), seguido del trimetropin/sulfametoxazol (cotrimoxazol).

Tabla 17. - Estudio de la Resistencia Antimicrobiana de las cepas de *E. coli* BLEE a los antibióticos testados.

<b>Grupo Farmacológico</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>Abrev.</b>	<b>% R</b>
Inh. B-lactamasas	Amoxicilina/Ac. clavulánico	AMC	<b>100</b>
B-lactámicos			
Penicilina	Ampicilina	AM	<b>100</b>
Cefalosporina 2G	Cefuroxima	CXM	<b>100</b>
	Cefuroxima Axetil	CXMa	<b>100</b>
	Cefoxitina	FOX	<b>100</b>
Cefalosporina 3G	Cefotaxima	CTX	<b>100</b>
	ceftazidima	CAZ	<b>100</b>
Cefalosporina 4G	Cefepima	FEP	<b>100</b>
Carbapenémicos	Ertapenem	ETP	<b>0</b>
	Imipenem	IPM	<b>0</b>
Aminoglucósidos	Amikacina	AN	<b>0</b>
	Gentamicina	GM	<b>6,75</b>
Quinolona	Ac. Nalidixico	NA	<b>92,4</b>
Fluoroquinolona	Ciprofloxacino	CIP	<b>65,4</b>
Gliciliclinas	Tigeciclina	TGC	<b>0</b>
Cotrimoxazol	Trimetropina/Sulfametoxazol	SXT	<b>24,1</b>

#### 4.1.2 Resistencia antibiótica de cepas de *K. pneumoniae* BLEE aislados

En la Tabla 18, se observa el porcentaje de resistencia del total de cepas de *K. pneumoniae* BLEE a los antibióticos ensayados. Las mayores resistencias, sin considerar a los  $\beta$ -lactámicos no carbapenémicos, aparecen en las quinolonas (ácido nalidixico y ciprofloxacina)

**Tabla 18.-** - Estudio de la Resistencia Antimicrobiana de las cepas de *K. pneumoniae* BLEE a los antibióticos testados.

Grupo Farmacológico	Antibiótico	Abrev.	% R
Inh. B-lactamasas	Amoxicilina/Ac. clavulánico	AMC	<b>100</b>
B-lactámicos			
Penicilina	Ampicilina	AM	<b>100</b>
Cefalosporina 2G	Cefuroxima	CXM	<b>100</b>
	Cefuroxima Axetil	CXMa	<b>100</b>
	Cefoxitina	FOX	<b>100</b>
Cefalosporina 3G	Cefotaxima	CTX	<b>100</b>
	ceftazidima	CAZ	<b>100</b>
Cefalosporina 4G	Cefepima	FEP	<b>100</b>
Carbapenémicos	Ertapenem	ETP	<b>0</b>
	Imipenem	IPM	<b>0</b>
Aminoglucósidos	Amikacina	AN	<b>0</b>
	Gentamicina	GM	<b>0</b>
Quinolona	Ac. Nalidixico	NA	<b>33.3</b>
Fluoroquinolona	Ciprofloxacino	CIP	<b>33.3</b>
Glicilciclinas	Tigeciclina	TGC	<b>0</b>
Cotrimoxazol	Trimetropina/Sulfametoxazol	SXT	<b>0</b>

## 4.2. Patrones de Resistencia en el total de muestras de cepas aisladas de *Enterobacteriaceae* BLEE

### 4.2.1. Patrones de Resistencia en el total de muestras de cepas aisladas de *E. coli* BLEE

En la Tabla 19, se observa los patrones de resistencia de *E. coli* BLEE en el total de las muestras estudiadas. Se observa que aparecen 8 patrones diferentes, siendo el patrón AMC + AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ+ FEP+ NA+ CIP el mayoritario. Así, el 47,3% de los *E. coli* BLEE son resistentes a los  $\beta$ -lactámicos, a excepción de los carbapenémicos, junto a las quinolonas (ácido nalidíxico y ciprofloxacina), que representan el patrón de resistencia nº 1. Un porcentaje importante (79,4%) presentan los tres patrones mayoritarios.

**Tabla 19.-** Patrones Resistencia en el total de muestras de cepas de *E. coli* BLEE

Nº	Resistencia Antibióticos	Frecuencia	%
1	AMC +AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ+ FEP+ NA+ CIP	112	47.3
2	AMC +AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + NA	49	20.7
3	AMC +AM + CXM + CXMa +CTX +CAZ + FEP + NA + CIP + SXT	27	11.4
4	AMC +AM + CXM + CXMa +CTX + CAZ + FEP	15	6.3
5	AMC +AM + CXM + CXMa +CTX +CAZ + FEP + NA + SXT	15	6.3
6	AMC +AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + GM + NA + CIP + SXT	12	5.0
7	AMC +AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + GM + NA + CIP	4	1.7
8	AMC +AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + SXT	3	1.3
	<b>Total</b>	<b>237</b>	<b>100.0</b>

Amoxicilina/Ac.clavulánico: AMC; Ampicilina: AM; Cefuroxima: CXM; Cefuroxima Axetil-CXI  
 Cefoxitina: FOX; Cefotaxima: CTX; ceftazidima: CAZ; Cefepima: FEP; Ertapenem: ETP; Imipenem: IPM;  
 Amikacina: AN; Gentamicina: GM; Ac. Nalidixico: NA; Ciprofloxacina: CIP; Tigeciclina: TGC;  
 Trimetropina/Sulfametoxazol: SXT

#### 4.2.2. Patrones de Resistencia en el total de muestras de cepas aisladas de *K. pneumoniae* BLEE

En la Tabla 20, se observa los patrones de resistencia de las 3 cepas de *K. pneumoniae* aisladas de las muestras estudiadas. Se observa que aparecen 2 patrones diferentes, siendo el patrón nº 4: AMC + AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ+ FEP, el que aparece en 2 ocasiones y en otro aislado de *K. pneumoniae* aparece el patrón nº 1, que es el predominante en los aislados de *E. coli*.

**Tabla20.-** Patrones Resistencia en el total de muestras de cepas de *K. pneumoniae* BLEE

Nº	Resistencia Antibióticos	Frecuencia	%
4	AMC + AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ+ FEP	2	66.7
1	AMC + AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ+ FEP + NA+ CIP	1	33.3
	<i>Total</i>	3	100

Amoxicilina/Ac.clavulánico: AMC; Ampicilina: AM; Cefuroxima:CXM; Cefuroxima Axetil-CXMa  
 Cefoxitina: FOX; Cefotaxima: CTX; ceftazidima: CAZ; Cefepima: FEP; Ertapenem: ETP; Imipenem: IPM;  
 Amikacina: AN; Gentamicina: GM; Ac. Nalidixico: NA; Ciprofloxacina: CIP; Tigeciclina: TGC;  
 Trimetropina/Sulfametoxazol: SXT

#### 4.3. Patrones Resistencia en las cepas de *E. coli* BLEE distribuidos por granjas

En la Tabla 21, se observan los patrones de resistencia de *E. coli* BLEE en el total de las muestras estudiadas de las granja 1. Se observa que aparecen 6 patrones diferentes, siendo el patrón nº 2 el mayoritario. El 40.9% son resistentes a los  $\beta$ -lactámicos no carbapenémicos y al ácido nalidíxico y el 27.2% de los *E. coli* BLEE son resistentes a los  $\beta$ -lactámicos junto a las quinolonas (ácido nalidíxico y ciprofloxacina).

**Tabla 21.** - Patrones Resistencia de muestras de cepas de *E. coli* BLEE Granja N°1

Nº	Resistencia Antibióticos	Frecuencia	%
2	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + NA	9	40.9
3	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + NA + CIP + SXT	6	27.2
6	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + GM +NA + CIP + SXT	4	18.1
1	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + NA + CIP	1	4.6
8	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + SXT	1	4.6
4	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP	1	4.6
	<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>100.0</b>

**Cefoxitina:** FOX; Cefotaxima: CTX; ceftazidima: CAZ; Cefepima: FEP; Ertapenem: ETP; Imipenem: IPM; Amikacina: AN; Gentamicina: GM; Ac. Nalidixico: NA; Ciprofloxacina: CIP; Tigeciclina: TGC;

Amoxicilina/Ac.clavulánico: AMC; Ampicilina: AM; Cefuroxima: CXM; Cefuroxima Axetil-CXMa  
Trimetropina/Sulfametoxazol: SXT

En la Tabla 22, se observan los patrones de resistencia de *E. coli* en las muestras estudiadas de las granja 2. Se observa que aparecen 5 patrones diferentes, siendo el patrón nº 3 el mayoritario. El 47,1% de los *E. coli* BLEE son resistentes a los  $\beta$ -lactámicos (no carbapenémicos) junto a las quinolonas (ácido nalidíxico y ciprofloxacina) y el cotrimoxazol.

**Tabla 22.-** Patrones Resistencia de muestras de cepas de *E. coli* BLEE Granja N°2

Nº	Resistencia Antibióticos	Frecuencia	%
3	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + NA + CIP + SXT	8	47.1
2	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + NA	7	36.8
4	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP	2	10.5
6	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + GM + NA + CIP + SXT	1	5.3
8	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + SXT	1	5.3
	<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>100.0</b>

Amoxicilina/Ac.clavulánico: AMC; Ampicilina: AM; Cefuroxima: CXM; Cefuroxima Axetil-CXMa  
Cefoxitina: FOX; Cefotaxima: CTX; ceftazidima: CAZ; Cefepima: FEP; Ertapenem: ETP; Imipenem: IPM;  
Amikacina: AN; Gentamicina: GM; Ac. Nalidixico: NA; Ciprofloxacina: CIP; Tigeciclina: TGC;  
Trimetropina/Sulfametoxazol: SXT

En la Tabla 23, se observan los patrones de resistencia de *E. coli* en las muestras estudiadas de la granja 3, donde aparecen 5 patrones diferentes, siendo el patrón nº 3 el mayoritario. El 38,1% de los *E. coli* BLEE son resistentes a los  $\beta$ -lactámicos (no carbapenémicos junto a las quinolonas (ácido nalidíxico y ciprofloxacina) y el cotrimoxazol. El patrón nº 1 se repite en el 27,8% de los *E. coli* BLEE aislados en esta granja.

Tabla 23.- Patrones Resistencia de muestras de cepas de *E. coli* BLEE Granja Nº3

Nº	Resistencia Antibióticos	Frecuencia	%
3	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ+ FEP+ NA+ CIP+ SXT	7	38.9
1	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + NA + CIP	5	27.8
2	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + NA	4	22.1
5	AMC+AM + CXM + CXMa +CTX + CAZ + FEP + NA + SXT	1	5.6
8	AMC+AM + CXM + CXMa +CTX +CAZ + FEP + SXT	1	5.6
	<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>100.0</b>

Amoxicilina/Ac.clavulánico: AMC; Ampicilina: AM; Cefuroxima: CXM; Cefuroxima Axetil-CXMa  
 Cefoxitina: FOX; Cefotaxima: CTX; ceftazidima: CAZ; Cefepima: FEP; Ertapenem: ETP; Imipenem: IPM;  
 Amikacina: AN; Gentamicina: GM; Ac. Nalidixico: NA; Ciprofloxacina: CIP; Tigeciclina: TGC;  
 Trimetropina/Sulfametoxazol: SXT

En la Tabla 24, se reflejan los patrones de resistencia de *E. coli* en las muestras estudiadas en la granja 4. Se encontraron 4 patrones diferentes, siendo el patrón nº 1 el mayoritario. El 44,6% de los *E. coli* BLEE son resistentes a los betalactámicos no carbapenémicos junto a las quinolonas (Ácido nalidíxico y Ciprofloxacina).

Tabla 24.- Patrones Resistencia de muestras de cepas de *E. coli* BLEE Granja Nº 4

Nº	Resistencia Antibióticos	Frecuencia	%
1	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ+ FEP+ NA+ CIP	15	44.6
2	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + NA	7	25.9
3	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + NA + CIP + STX	3	11.1
4	AMC+AM + CXM + CXMa +CTX + CAZ + FEP	2	7.4
	<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>100.0</b>

Amoxicilina/Ac.clavulánico: AMC; Ampicilina: AM; Cefuroxima: CXM; Cefuroxima Axetil-CXMa  
 Cefoxitina: FOX; Cefotaxima: CTX; ceftazidima: CAZ; Cefepima: FEP; Ertapenem: ETP; Imipenem: IPM;  
 Amikacina: AN; Gentamicina: GM; Ac. Nalidixico: NA; Ciprofloxacina: CIP; Tigeciclina: TGC;  
 Trimetropina/Sulfametoxazol: SXT

En la Tabla 25, se observan los patrones de resistencia de *E. coli* las muestras estudiadas en la granja 5. Se detectaron 4 patrones diferentes, siendo el patrón nº 1 el mayoritario. El 68.5% de los *E. coli* BLEE son resistentes a los betalactámicos no carbapenémicos junto a las quinolonas (Ácido nalidíxico y Ciprofloxacina).

Tabla 25.- Patrones Resistencia de muestras de cepas de *E. coli* BLEE Granja Nº 5

Nº	Resistencia Antibióticos	Frecuencia	%
1	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + NA + CIP	13	68.5
3	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + GM + NA + CIP + SXT	2	10.5
2	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + NA	2	10.5
4	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP	2	10.5
	<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>100.0</b>

Amoxicilina/Ac.clavulánico: AMC; Ampicilina: AM; Cefuroxima: CXM; Cefuroxima Axetil-CXMa  
 Cefoxitina: FOX; Cefotaxima: CTX; ceftazidima: CAZ; Cefepima: FEP; Ertapenem: ETP; Imipenem: IPM;  
 Amikacina: AN; Gentamicina: GM; Ac. Nalidixico: NA; Ciprofloxacina: CIP; Tigeciclina: TGC;  
 Trimetropina/Sulfametoxazol: SXT

En la Tabla 26, se reflejan los patrones de resistencia de *E. coli* encontrados en la granja 6. En ésta solo se detectaron 2 patrones diferentes, siendo el patrón nº 1 el mayoritario. El 96,3% de los *E. coli* BLEE son resistentes a la mayoría de los betalactámicos junto al Ácido Nalidíxico.

Tabla 26.- Patrones Resistencia de muestras de cepas de *E. coli* BLEE Granja Nº 6

Nº	Resistencia Antibiótico	Frecuencia	%
1	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + NA + CIP	26	96.3
6	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + NA + CIP + SXT	1	3.7
	<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>100.0</b>

Amoxicilina/Ac.clavulánico: AMC; Ampicilina: AM; Cefuroxima: CXM; Cefuroxima Axetil-CXMa  
 Cefoxitina: FOX; Cefotaxima: CTX; ceftazidima: CAZ; Cefepima: FEP; Ertapenem: ETP; Imipenem: IPM;  
 Amikacina: AN; Gentamicina: GM; Ac. Nalidixico: NA; Ciprofloxacina: CIP; Tigeciclina: TGC;  
 Trimetropina/Sulfametoxazol: SXT

En la Tabla 27, se observan los patrones de resistencia de *E. coli* detectados en la granja 7. Se encontraron 4 patrones diferentes, siendo el patrón nº 2 y el número 4 los detectados en el 29,6% de los aislados de *E. coli* BLEE.

Tabla 27.- Patrones Resistencia de muestras de cepas de *E. coli* BLEE Granja N° 7

Nº	Resistencia antibiótico	Frecuencia	%
2	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ+ FEP+ NA	8	29.6
4	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP	8	29.6
1	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + NA + CIP	7	26.0
5	AMC+AM + CXM + CXMa +CTX + CAZ + FEP + NA + STX	4	14.8
	<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>100.0</b>

Amoxicilina/Ac.clavulánico: AMC; Ampicilina: AM; Cefuroxima: CXM; Cefuroxima Axetil-CXMa  
 Cefoxitina: FOX; Cefotaxima: CTX; ceftazidima: CAZ; Cefepima: FEP; Ertapenem: ETP; Imipenem: IPM;  
 Amikacina: AN; Gentamicina: GM; Ac. Nalidixico: NA; Ciprofloxacina: CIP; Tigeciclina: TGC;  
 Trimetropina/Sulfametoxazol: SXT

En la Tabla 28, se observan los patrones de resistencia de *E. coli* detectados en la granja 8. Se detectaron 4 patrones diferentes. El 53,9 % de los *E. coli* BLEE son resistentes a los betalactámicos no carbapenémicos junto a las quinolonas (Ácido nalidíxico y Ciprofloxacina), que corresponde con el patrón de resistencia nº 1.

Tabla 28.- Patrones Resistencia de muestras de cepas de *E. coli* BLEE Granja N° 8

Nº	Resistencia Antibióticos	Frecuencia	%
1	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ+ FEP+ NA + CIP	14	53.9
5	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + NA + STX	7	26.9
6	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + GM + NA + CIP	3	11.6
3	AMS+AM + CXM + CXMa +CTX + CAZ + FEP + GM + NA + CIP + SXT	2	7.7
	<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>100.0</b>

Amoxicilina/Ac.clavulánico: AMC; Ampicilina: AM; Cefuroxima: CXM; Cefuroxima Axetil-CXMa  
 Cefoxitina: FOX; Cefotaxima: CTX; ceftazidima: CAZ; Cefepima: FEP; Ertapenem: ETP; Imipenem: IPM;  
 Amikacina: AN; Gentamicina: GM; Ac. Nalidixico: NA; Ciprofloxacina: CIP; Tigeciclina: TGC;  
 Trimetropina/Sulfametoxazol: SXT

En la Tabla 29, se reflejan los patrones de resistencia de *E. coli* detectados en la granja 9. Existen 4 patrones diferentes, siendo el patrón nº 1 el mayoritario. El 53 % de los *E. coli* BLEE son resistentes a la mayoría de los  $\beta$ -lactámicos junto a las quinolonas (Ácido nalidíxico y Ciprofloxacina).

Tabla 29.- Patrones Resistencia de muestras de cepas de *E. coli* BLEE Granja Nº 9

Nº	Resistencia Antibióticos	Frecuencia	%
1	AMS+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ+ FEP + NA+ CIP	15	60
2	AMS+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + NA	7	28
7	AMS+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + GM + NA + CIP	1	4
3	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + NA + CIP + SXT	1	4
5	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX +CAZ + FEP + NA + SXT	1	4
	<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>100.0</b>

Amoxicilina/Ac.clavulánico: AMC; Ampicilina: AM; Cefuroxima: CXM; Cefuroxima Axetil-CXMa  
 Cefoxitina: FOX; Cefotaxima: CTX; ceftazidima: CAZ; Cefepima: FEP; Ertapenem: ETP; Imipenem: IPM;  
 Amikacina: AN; Gentamicina: GM; Ac. Nalidixico: NA; Ciprofloxacina: CIP; Tigeciclina: TGC;  
 Trimetropina/Sulfametoxazol: SXT

En la Tabla 30, se reflejan los patrones de resistencia de *E. coli* detectados en la granja 10. En esta granja encontramos 4 patrones diferentes, siendo el patrón nº 1 el mayoritario. El 59 % de los *E. coli* BLEE son resistentes a los  $\beta$ -lactámicos no carbapenémicos junto a las quinolonas (ácido nalidíxico y ciprofloxacina).

Tabla 30.- Patrones Resistencia de muestras de cepas de *E. coli* BLEE Granja Nº10

Nº	Resistencia Antibiótico	Frecuencia	%
1	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ+ FEP+ NA+ CIP	16	59.3
2	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + NA	5	18.5
6	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + GM + NA + CIP + SXT	3	11.1
5	AMC+AM+AM + CXM + CXMa +CTX + CAZ + FEP + NA + SXT	2	7.4
3	AMC+AM + CXM + CXMa +CTX +CAZ + FEP + NA + CIP + SXT	1	3.7
	<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>100.0</b>

Amoxicilina/Ac.clavulánico: AMC; Ampicilina: AM; Cefuroxima: CXM; Cefuroxima Axetil-CXMa  
 Cefoxitina: FOX; Cefotaxima: CTX; ceftazidima: CAZ; Cefepima: FEP; Ertapenem: ETP; Imipenem: IPM;  
 Amikacina: AN; Gentamicina: GM; Ac. Nalidixico: NA; Ciprofloxacina: CIP; Tigeciclina: TGC;  
 Trimetropina/Sulfametoxazol: SX



## ***V. Discusión***

**V.1.*****Prevalencia de Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en muestras de pollos sanos***

---

La enorme diseminación de cepas de *Escherichia coli* productor de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), fundamentalmente de la clase CTX-M, en la microbiota intestinal de animales sanos, como indican diversos autores, es realmente preocupante (Dierikx *et al.*, 2010; Randall *et al.*, 2010; Dierikx *et al.*, 2013). Su evolución parece haber ido de manera paralela, aunque en una escala muy superior, al aumento en la detección de este tipo de bacterias resistentes en el ecosistema intestinal de humanos (Leverstein *et al.*, 2011; Dierikx *et al.*, 2013).

Aunque, las primeras descripciones de estas enzimas en cepas clínicas de humanos datan de finales de los años ochenta y principios de los noventa (Knothe *et al.*, 1983; Barquero *et al.* 1987; Fernández-Rodríguez *et al.*, 1992a), no ha sido hasta las últimas décadas cuando se está produciendo un importante y “explosivo” aumento de este tipo de enzimas, así lo indican diversos estudios realizado fuera de España (Pitout & Laupland 2008; Peirano *et al.*, 2010; Pitout *et al.*, 2010; Enoch *et al.*, 2012; Lowe *et al.*, 2013; Korzeniewsk & Harnisz 2013) y en España, tanto a nivel hospitalario (Oteo *et al.*, 2010) como ambulatorio (Rodríguez-Baño & Navarro 2008).

El empleo de cefalosporinas de amplio espectro en animales podría ser un factor de selección de bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, unido al sistema de cría intensiva y el hacinamiento al que se ven sometidos con frecuencia los animales, lo que facilita enormemente, tanto el intercambio de bacterias entre individuos como el intercambio de genes de resistencia entre bacterias (Leverstein-van Hall *et al.*, 2011).

Lo que parece claro es que este tipo de sistema de producción de ciertos de animales destinados al consumo humano es idóneo para la diseminación de bacterias y de genes de resistencia entre los animales y que la cepas productoras de BLEE representan una amenaza desde el punto de vista de Salud Pública, pero también desde el punto de vista animal (Bonnet *et al*, 2007; Geser *et al.*, 2012). La capacidad de esta cepa de extenderse a diferentes especies animales, colonizar y posteriormente penetrar en la cadena alimentaria ya ha sido documentada, sin embargo el papel de los alimentos como fuente de contaminación humana no está claro. Una estrecha cooperación entre los profesionales de la salud y los veterinarios es de vital importancia para controlar, gestionar y minimizar la propagación de BLEE asociado al ganado de allí la importancia del estudio de las BLEE (Ewer *et al.*, 2011).

En nuestro estudio hemos aislado 237 cepas de enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamas de espectro extendido (BLEE), procedentes de muestras rectales de 261 pollos sanos, lo que supone una prevalencia del 90,8%. La hipótesis inicial presumía que dichas cepas aisladas deberían ser en su mayoría comensales, ya que en las granjas objeto de estudio no se habían reportado casos de animales que presentaran infecciones compatibles con *E. coli*.

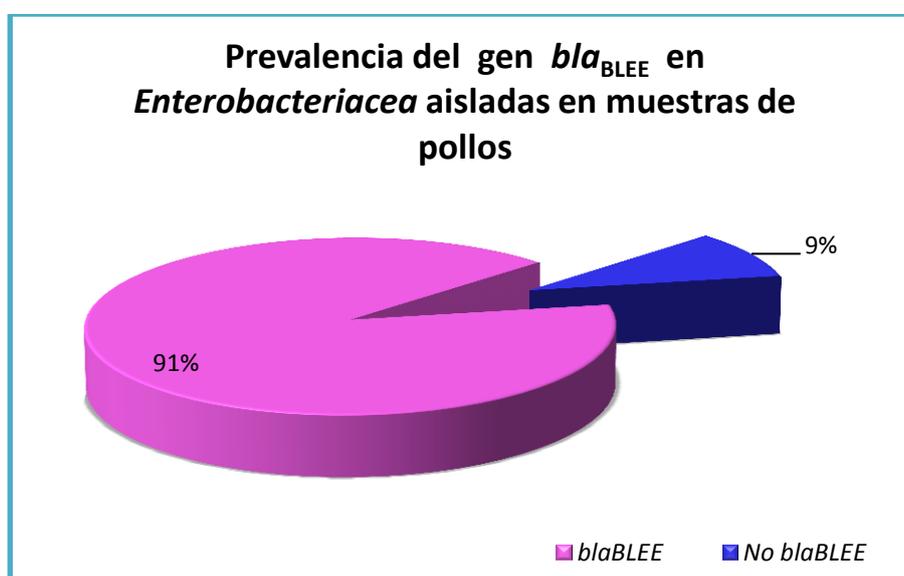
Nosotros recogimos muestras rectales de pollos de 10 granjas avícolas, de diversas zonas de la isla de Tenerife, todas ellas de cría intensiva. En la imagen se observa una de las granjas de pollos en la que realizamos la toma de muestras de nuestro estudio.



Como podemos observar en dicha imagen, en las granjas existía un elevado hacinamiento de los pollos, lo que favorece la diseminación de cepas resistentes. Esta diseminación está descrita en diversos estudios (Li *et al.*, 2010; Horton *et al.*, 2011; Geser *et al.*, 2012).

En la Figura 35, se representa la prevalencia del gen  $\beta$ -lactamasas en las cepas de *Enterobacteriaceae* ( $bla_{BLEE}$ ) aisladas en muestras rectales de pollo de engorde en granjas en la Isla de Tenerife-España obtenidas en nuestro estudio.

Figura. 35. Prevalencia del gen ( $bla_{BLEE}$ ) aisladas en muestras rectales de pollo



Con respecto a las especies aisladas, hemos encontrado como productoras de enzimas de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, 237 cepas de la especie *Escherichia coli* y dos cepas de *Klebsiella pneumoniae*. La prevalencia de *E. coli* BLEE en nuestro estudio fue muy elevada (90,8%) y la de *K. pneumoniae* fue muy inferior a la tasa de *E. coli* (1,1%).

*E. coli* es la enterobacteria productora de BLEEs que se aísla con más frecuencia en humanos y en los animales de granja, especialmente en pollos y también en diversos alimentos y dentro de éstos en la carne de estas aves. Es una bacteria comensal en los seres humanos y los animales y tiene una amplia gama de hospedadores. Está de forma común presentes en el medio ambiente y se considera un indicador de la contaminación fecal en los alimentos y el agua. *E. coli* pueden adquirir, mantener y

transmitir los genes de resistencia de otros organismos en el medio ambiente (Bonnet *et al.*, 2009). Debido a su ubicuidad en los seres humanos, los animales y su papel como un organismo comensal y patógena, la *E. coli* se ha convertido en uno de los microorganismos que son comúnmente resistentes a los antimicrobianos (Zhao, *et al.*, 2012).

Así, en España en un estudio sobre la importancia de las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en animales, Torres & Zarazaga (2007), indicaron que existe una gran preocupación por el incremento observado de cepas clínicas portadoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), fundamentalmente en aislados procedentes de pacientes de la comunidad y por la importancia que están adquiriendo ciertos tipos de  $\beta$ -lactamasas. En la revisión también indicaron que, mientras que en un principio *Klebsiella* era el género que con mayor frecuencia se refería asociado a la presencia de BLEE, ahora está teniendo una especial relevancia la especie *Escherichia coli* con relación a este mecanismo de resistencia de las bacterias.

Existen diversos estudios que evalúan la prevalencia de Enterobacterias BLEE en muestras recogidas en pollos sanos vivos tanto en el ámbito nacional como el internacional, comparando los datos de nuestro estudio con los aportados por ellos en relación al número de muestra, en su mayoría, es inferior al nuestro y en algunos incluyen no sólo muestras recogidas en pollos sino en otros animales.

Uno de los primeros informes de la detección de BLEE en los animales productores de alimentos se realizó en aislados de *E. coli* recuperados durante el período 2000-2001 a partir de muestras fecales de pollos sanos a nivel de matadero, obtenidos como parte del programa de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en España (Briñas *et al.*, 2003b). En este estudio, de 120 aislados *E. coli* se obtuvieron 5 cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas, obteniendo una prevalencia del 4,2%, muy inferior a la obtenida por nosotros. En otro estudio realizado en el 2003 por Briñas *et al.* (2005) encontraron un aumento en el porcentaje de *E. coli* productora de BLEE aisladas entre aislamientos fecales comensales, encontrando una prevalencia muy inferior a la nuestra (10 de 158 aislamientos (6.3%)).

La tabla 32., refiere la Prevalencia de colonización de pollos por *E. coli BLEE* en distintos estudios consultados.

Tabla 32. Prevalencia de colonización de pollos por *E. coli BLEE*

Referencia	País	Prevalencia
Briñas <i>et al.</i> , 2003	España	4.2%
Briñas <i>et al.</i> , 2005	España	6.3%
Smet <i>et al.</i> , 2008	Bélgica	45%
Costa <i>et al.</i> , 2009	Portugal	42.1%
Yuan <i>et al.</i> , 2009	China	80%
Li <i>et al.</i> , 2010	China	67%
Randall <i>et al.</i> , 2010	Gran Bretaña	50%
Geser <i>et al.</i> , 2011	Suiza	6,3%

Kojima *et al.*, (2005), un estudio en Japón, realizaron un muestreo para la detección de *E. coli BLEE* aisladas de distintos animales destinados al consumo humano, refiriendo que sólo en las muestras de pollos fue aislado este tipo de bacterias. Ellos sugirieron la existencia de algún factor ambiental específico que se encontraba en las granjas de pollo de engorde y no en las de otros animales, probablemente debido a las condiciones de hacinamiento que son mayores en los pollos que en los otros animales de abasto.

En nuestro estudio encontramos que en el 100% de las granjas de pollos muestreadas fueron positivos en la detección de estas cepas multirresistentes. Mesa *et al.*, (2006) realizaron un estudio sobre la búsqueda de *Enterobacteriaceae BLEE* en diferentes ambientes, encontrando que en el 100% de las granjas estudiadas aparecían estas cepas productoras de BLEE aisladas de muestras de suelo y de materia fecal de los

animales testados, lo que refleja una expansión global de estas enzimas. Estos estudios sugieren que la comunidad podría actuar como un reservorio en la diseminación de estas cepas comunitarias desde las granjas y que se deberían de tomar las máximas medidas higiénicas para evitarlo.

Smet *et al.*, (2008) en un estudio realizado en 5 granjas de Bélgica encontraron en 489 exudados rectales de pollos una prevalencia total del 45% para *E. coli* BLEE, apareciendo variaciones por granjas, oscilando desde un 0% a un 73%, valores todos inferiores a los encontrados en nuestro estudio.

Costa *et al.*, (2009) realizaron un estudio para determinar la prevalencia de *E. coli* BLEE en muestras fecales de pollos de engorde recogidas a nivel de mataderos en Portugal, encontrando una prevalencia del 42.1% y concluyendo sobre la importancia del intestino de estos animales como reservorio de este tipo de cepas multirresistentes. También este estudio presenta valores inferiores a los del nuestro.

Yuan *et al.* (2009) indicaron la importancia de *E. coli* BLEE como amenaza para la salud humana y avícola. En este estudio recogieron muestras de 14 granjas avícolas diferentes en la provincia de Henan en China, entre diciembre de 2007 y agosto de 2008. La prevalencia de *E. coli* productor BLEE fue del 80%, indicando los autores la preocupante elevada colonización por este microorganismo de los pollos en ese país.

En otro estudio realizado en China por Li *et al.*, (2010), investigaron la presencia de cepas BLEE de 696 *Escherichia coli* aislados de pollo durante un largo período de tiempo. Encontraron que estas cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas no surgieron hasta 2004 y la tasa de detección fue de 18,5% entre 2004 y 2007. Ellos concluyen que la tendencia al alza de la resistencia a los antimicrobianos y la alta prevalencia de los de  $\beta$ -lactamasas en *E. coli* de cepas de pollo, puede atribuirse al uso excesivo de antibióticos, especialmente  $\beta$ -lactámicos, en la producción de aves de corral.

También en China, Li *et al.*, (2010) encontraron en muestras rectales de 224 pollos testados en 6 granjas avícolas, una prevalencia del 67% de *E. coli* BLEE, indicando que estos valores son superiores a los encontrados en el mismo estudio en granjas de

cerdo y dándole una gran importancia a las granjas de pollos como reservorio de estas bacterias multirresistentes.

Diversos estudios hablan de la diseminación en Europa de cepas de *E. coli* BLEE aisladas en los pollos. Así, Dierikx *et al.*, (2010), indica el aumento de la prevalencia de *E. coli* BLEE, relacionándola con el uso indiscriminado de antibióticos en veterinaria.

Otro estudio de Derikx *et al.*, (2010), describieron un aumento de la prevalencia de *Escherichia coli* BLEE en el tracto gastrointestinal de animales sanos productores de alimentos sanos, en especial pollos, pasando del 3% en 2003 al 15% en 2008 y en 2009, se detectaron en el 100% de las granjas estudiadas (26 granjas). Estos resultados del 2009 concuerdan con los obtenidos por nosotros con un 100% de granjas positivas.

Randall *et al.*, (2010) en un estudio realizado con la finalidad de determinar la prevalencia de *Escherichia coli* productor de  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (BLEE) en las aves en Gran Bretaña, encontraron que el 50% de las muestras de pollo tenían un crecimiento positivo para estas bacterias resistentes, indicando que este resultado sugiere un alto porcentaje de colonización de estos animales por este tipo de cepas. El porcentaje es claramente inferior al nuestro.

En este mismo país, Horton *et al.*, (2011) estudiaron la prevalencia de estos microorganismos en ganado vacuno, cerdos y pollos, encontrando la mayor prevalencia, así como el mayor recuento de estas bacterias en muestras procedentes de pollos, indicando que es importante determinar el número absoluto de bacterias que secretan los animales a la hora de realizar los estudios epidemiológicos para evaluar los riesgos de transmisión de estas bacterias por los alimentos.

Geser *et al.*, (2011) en un estudio realizado en Suiza sobre prevalencia de *Enterobacteriaceae* BLEE en distintos animales de granja (vacas, cerdos, ovejas y pollos) en 100 granjas diferentes encontraron una prevalencia variable según el animal. En los pollos la prevalencia fue del 63,4% muy superior a la encontrada en las muestras de los otros animales estudiados, pero inferior a la encontrada por nosotros. Este estudio también indica que la especie más comúnmente aislada fue *E. coli*, estos resultados concuerdan con los obtenidos por nosotros. Así, en el total de animales

muestreados encontraron 91 cepas de Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido: 89 cepas *E. coli*, 1 cepa *Citrobacter youngae* y 1 cepa *Enterobacter cloacae*.

Esta prevalencia de *E. coli* BLEE frente al resto de enterobacterias es un fenómeno que aparece también reflejado en las cepas de origen humano. Así en un estudio realizado en España por García-Hernández *et al.*, (2011) indican que hasta finales de los años noventa la mayoría de las BLEE (principalmente de tipo TEM y SHV) se aislaban en cepas de *K. pneumoniae* implicadas en brotes nosocomiales, sobre todo en unidades de cuidados intensivos. Actualmente la atención se centra en el cambio epidemiológico que se está produciendo en cuanto a los tipos de BLEE más prevalentes y su distribución, con mayor presencia en *E. coli* procedente del medio extrahospitalario. Concluyen que en humanos, el principal reservorio de *E. coli* con BLEE es el tracto digestivo, y su transmisión se facilita por el contacto a través de las manos, habiéndose descrito transmisión plasmídica y bacteriana de estas enzimas entre personas en contacto estrecho, pero también hay que considerar que ciertos alimentos de origen animal, principalmente en relación con las aves de corral, podrían ser fuente de transmisión de enzimas BLEE al hombre. Esto concuerda por lo descrito por otros autores (Warren *et al.*, 2008; Smet *et al.*, 2008).

También existen diversos estudios sobre la relación de *E. coli* BLEE aislados de animales para el consumo y las cepas humanas. En España, Cortés *et al.*, 2010, aislaron y caracterizaron cepas de *Escherichia coli* multirresistentes a partir de cepas potencialmente patógenas para humanos en muestras rectales de pollo y cerdo en granjas. En el caso de las muestras rectales de pollo encontraron una alta prevalencia de cepas *E. coli* BLEE. Entre los 86 aislamientos de granja, 23(26,7%) tenían dos o más genes de virulencia típicos de *E. coli* patógena extraintestinal. De éstos, 20 fueron aislados de granjas avícolas y sólo 3 de las granjas porcinas. Cuatro de estos grupos contenían cepas con dos o más genes de virulencia. Los resultados hacen especial hincapié en el riesgo zoonótico que plantea especialmente las granjas de aves de corral, pero también las granjas de cerdos, como reservorios de *E. coli* BLEE.

Existen diversos estudios que hablan del paso de las cepas de los pollos a la carne y de ésta al hombre.

Leverstein *et al.*, (2011) en Dinamarca realizan un estudio para comparar las cepas de *E. coli* BLEE en humanos con la existentes en pollos y muestras de carne de venta al por menor. Encontraron que el 94% de las muestras de carne de pollo contenían cepas productoras de BLEE, de los cuales el 39% pertenecían a *E. coli* con genotipos presentes en muestras humanas recogidas de hospitales de la zona. Ellos concluyeron que estos resultados son indicativos de la transmisión de genes de BLEE, plásmidos y aislados de *E. coli* de las aves a los seres humanos, muy probablemente a través de la cadena alimentaria. Los autores indican que si bien en humanos ha existido un importante control del uso de antimicrobianos, esto no ha ocurrido en veterinaria, de ahí la elevada aparición de estas cepas de origen animal y consideran que la industria de las aves de corral es un posible reservorio de bacterias Gramnegativas productoras de BLEE, que pueden ser adquiridos por los seres humanos por manipulación o el consumo de carne contaminada.

Johnson *et al.*, (2012) estudiaron las asociaciones entre la resistencia a múltiples fármacos, el plásmido contenido, y el potencial de virulencia entre el patotipo *Escherichia coli* patogénica extraintestinal (ExPEC), las cepas *E. coli* comensales de humanos y las cepas *E. coli* de aves de corral (*Avian Pathogenic Escherichia coli*). Ellos sugieren que la cepas de *Escherichia coli* aviar, poseen comúnmente la capacidad de resistir a múltiples agentes antimicrobianos, y pueden servir como reservorios de plásmidos de resistencia para *Escherichia coli* extraintestinales patógena y comensales en humanos. Concluyen que estos hallazgos sugieren que en *E. coli* extraintestinales, la multirresistencia se asocia más comúnmente con plásmidos, y que estos plásmidos se encuentran con frecuencia en cepas *E. coli* aviar a partir de los sistemas de producción de aves de corral.

Recientemente, Dierikx *et al.*, (2013), realizaron un trabajo cuyo objetivo fue establecer la prevalencia de *E. coli*  $\beta$ -lactamasas (BLEE) y AmpC en las granjas de pollos de engorde y en los agricultores holandeses y comparar las cepas de los animales con las humanas. Encontraron resultados positivos para todas las granjas y

un porcentaje de positividad en los pollos del 80% y el 33,3% (6/18) granjeros y 5 aislamientos eran similares genéticamente a los obtenidos en los pollos. Ellos indican la existencia de una alta prevalencia de aves que transportan *E. coli* BLEE / AmpC y una alta prevalencia de *E. coli* BLEE / AmpC en los granjeros, lo que consideran no es deseable, debido al riesgo que esto supone para la salud humana y que la investigación futura debe centrarse en la identificación de la fuente de estas cepas en la cadena de producción de pollos para hacer intervenciones preventivas cuyo resultado sea la reducción de estas cepas.

Bortolaia *et al.*, (2011) realizaron un estudio para evaluar el rango de patogenicidad de las cepas de *E. coli* aisladas de pollos y encuentra que el 9% de las aves son productores de cepas de *E. coli* BLEE. De éstos, el 21% eran potencialmente patógenas para las aves de corral, y el 44% pertenecía a cepas previamente aisladas de humanos. Ellos concluyen que estos hallazgos sugieren que una proporción moderada de cepas de *E. coli* BLEE aislados en las aves son patógenas para las aves de corral y que el elevado potencial de patogenicidad de estas cepas es preocupante en la producción de aves de corral, ya que al tener un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos, se ven limitadas las opciones terapéuticas disponibles para el tratamiento de pollos.

En los últimos años existe una gran preocupación de las autoridades sanitarias del país de estas cepas resistentes a través de la cadena alimentaria. La posibilidad de que la cadena alimentaria sea un vehículo importante de transferencia de genes de resistencia al hombre ha sido planteada por distintos autores (Wang *et al.*, 2006), y se ha sugerido un origen alimentario a la presencia de cepas de *E. coli* portadoras de BLEE en la microbiota intestinal de humanos (Prats *et al.*, 2003).

Se han realizado diversos estudios para determinar la prevalencia de Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en carne de pollo y otros animales de abasto. La mayoría refiere a cepas de *E. coli* BLEE como la que se aísla con más frecuencia de los alimentos.

En un estudio realizado en Alemania por Kola *et al.*, (2011), en un total de 399 muestras de carne de pollo de nueve cadenas de supermercados, cuatro tiendas de

alimentos orgánicos y una carnicería en dos regiones geográficas distintas de Alemania (Berlín y Greifswald) encontraron una prevalencia del 43%, siendo la mayoría *E. coli* BLEE. Ellos concluyeron la prevalencia de estas cepas de *E. coli* resistentes es elevada en carne de pollo. No encontraron diferencias en la prevalencia de los *E. coli* productores de BLEE entre las muestras orgánicas y convencionales. Ellos concluyen que la alta tasa de corresponsencia a diferentes clases de antibióticos de estas cepas podría reflejar el uso común en veterinaria de estas y otras sustancias, y que sería necesario de forma urgente, evaluar aún más el papel de las aves de corral en la transmisión de bacterias productoras BLEE altamente resistentes en los seres humanos.

Doi *et al.*, (2010), comparan la prevalencia de *E. coli* BLEE de dos ciudades, una española, Sevilla y otra americana Pittsburgh, encontrando un porcentaje de colonización del 67% (8/12) en la carne de pollos de venta al menor en Sevilla y el 85% (17/20) en Pittsburgh, indicando que la carne de pollo es una fuente potencial de estos microorganismos.

En un estudio realizado en Alemania por Kola *et al.*, (2011), en un total de 399 muestras de carne de pollo de nueve cadenas de supermercados, cuatro tiendas de alimentos orgánicos y una carnicería en dos regiones geográficas distintas de Alemania (Berlín y Greifswald) encontraron una prevalencia del 43%, siendo la mayoría *E. coli* BLEE. Ellos concluyeron la prevalencia de estas resistentes es elevada en carne de pollo. No encontraron diferencias en la prevalencia de los *E. coli* productores de BLEE entre las muestras orgánicas y convencionales. Ellos concluyen que la alta tasa de corresponsencia a diferentes clases de antibióticos de estas cepas podría reflejar el uso común en veterinaria de estas y otras sustancias, y que sería necesario de forma urgente evaluar aún más el papel de las aves de corral en la transmisión de bacterias productoras de BLEE altamente resistentes a los seres humanos.

Así Junying *et al.*, (2012), hablan de que cepas productoras  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), se han detectado cada vez más en los alimentos de origen animal en diferentes países desde 2002 y han ganado considerable atención en todo el mundo.

Sheikh *et al.*, (2012), realizaron una investigación en Alberta (Canadá) sobre detección de *E. coli* BLEE en diversos tipos de carnes y encontraron una prevalencia de *E. coli* BLEE en carne de pollo del 18%, superior a la encontrada en carne de vacuno.

Park *et al.*, (2012) realizan un estudio en Pittsburgh, USA, donde analizaron diversas carnes recogidas en carnicerías. Encontraron que la prevalencia de *E. coli* BLEE fue del 31.8% para la carne de pollo, de 22 muestras analizadas 7 muestras dieron positivas.

Egea *et al.*, (2012) en Sevilla, estudian la colonización de la carne de pollo en dos diferentes años, encontrando que la prevalencia de *E. coli* BLEE en el hábitat de su estudio va en aumento, desde 62.5% en 2007 a 93.3% en 2010 ( $p=0.005$ ).

Gregova *et al.*, (2012) realizaron un estudio en un matadero de pollos con la finalidad de investigar la presencia de cepas de *E. coli* resistentes a los antibióticos aislados de bioaerosoles y de superficie en un matadero y relacionarlo como una posible fuente de contaminación de la carne de aves de corral. La más alta contaminación del aire con coliformes fue durante la matanza y evisceración de las aves de corral, revelando la presencia de BLEE en 43% de los aislamientos de *E. coli*. Ellos consideran que la contaminación ambiental con estas cepas en los mataderos tiene una gran importancia en la posterior colonización de la carne de pollo que posteriormente se va a comercializar.

**V.2.**  
**Tipos de  $\beta$ -lactamasas de espectro  
extendido (BLEE) en muestras de pollos  
sanos**

---

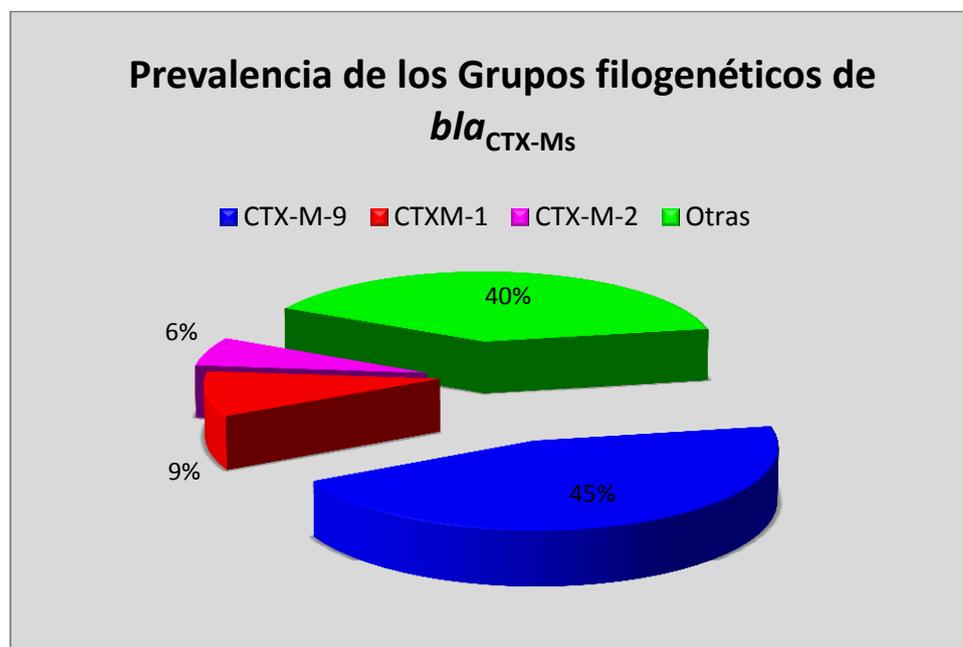
Las infecciones por *E. coli* de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE) en humanos han experimentado importantes cambios epidemiológicos en los últimos tiempos y actualmente la atención se centra en el aumento de infecciones y colonizaciones en pacientes procedentes de la comunidad, sobre todo en relación con instituciones sanitarias, y la mayor incidencia de las  $\beta$ -lactamasas CTX-M (*bla*<sub>CTX-M</sub>) frente a otros tipos de BLEE (García-Hernández *et al.*, 2011). Así Torres and Zarazaga, 2007, indican que en la actualidad existe una gran preocupación por el incremento observado de cepas clínicas productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), fundamentalmente en aislados procedentes de pacientes de la comunidad y por la importancia que están adquiriendo ciertos tipos de  $\beta$ -lactamasas, especialmente las del grupo CTX-M, que están desplazando a otras predominantes de los tipos TEM o SHV. Además, mientras que en un principio *Klebsiella* era el género que con mayor frecuencia se refería asociado a la presencia de BLEE, ahora está teniendo una especial relevancia la especie *Escherichia coli* en relación con este mecanismo de resistencia.

En la actualidad se conocen más de trescientos tipos de BLEE, que se clasifican en base a su secuencia aminoacídica, la mayoría de ellas descritas por primera vez en países Europeos. Hasta finales de los años noventa la mayoría de las BLEE (principalmente de tipo TEM y SHV) se aislaban en cepas de *K. pneumoniae* implicadas en brotes nosocomiales, sobre todo en unidades de cuidados intensivos. Hoy en día, la atención se centra en el cambio epidemiológico que se está produciendo en cuanto a los tipos de BLEE más prevalentes y su distribución, con mayor presencia en *E. coli* procedente del medio extrahospitalario (principalmente en aislamientos de muestras urinarias) y en relación con BLEE del tipo cefotaximasas (CTX-M) (García-Hernández *et al.*, 2011).

En humanos, el principal reservorio de *E. coli* con BLEE es el tracto digestivo. También se ha considerado que ciertos alimentos de origen animal, principalmente en relación con las aves de corral, podrían ser fuente de transmisión de enzimas BLEE al hombre (Smet *et al.*, 2008).

En la Figura 36, se representa la prevalencia de los diferentes tipos de  $\beta$ -lactamasas CTX-M ( $bla_{CTX-M}$ ) obtenidas en nuestro estudio de los 196 aislados *E. coli* BLEE. Como se observa la gran mayoría (45%) fueron del tipo CTX-M-9, como se observa en la gráfica.

Figura 36: Prevalencia de los grupos filogenéticos del gen  $bla_{CTX-M}$  en nuestro estudio.



Torres and Zarazaga (2007) realizan una revisión sobre BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos. En su trabajo exponen que en 1998 se aisló la primera bacteria de origen animal portadora de una  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE) (*Escherichia coli* productora de SHV<sub>-12</sub>), y desde esa fecha estamos asistiendo a un alarmante incremento en la detección de BLEE, fundamentalmente del

grupo CTX-M, en cepas de *E. coli* en animales sanos destinados al consumo humano, y en menor medida en animales de compañía, e incluso en salvajes.

Elas indican que las BLEE detectadas en *E. coli* de animales fueron: el 79% del tipo CTX-M (variantes CTX-M<sub>-1</sub>, CTX<sub>-9</sub>, CTX<sub>-14</sub>, CTX<sub>-15</sub>, y CTX<sub>-32</sub> en Europa, y CTX-M<sub>-2</sub>, CTX<sub>-3</sub>, CTX<sub>-13</sub>, CTX<sub>-14</sub>, CTX<sub>-24</sub>, y CTX<sub>-27</sub> en Asia), el 15% del tipo SHV (variantes SHV<sub>-12</sub>, CTX<sub>-2</sub> y CTX<sub>-5</sub> en Europa), y el 6% del tipo TEM (variante TEM<sub>-52</sub> en Europa). En su revisión exponen que Las BLEE mayoritarias en *E. coli* son CTX-M<sub>-14</sub>, CTX-M<sub>-1</sub>, siendo en aves la mayoritaria la CTX-M<sub>-14</sub>. Concluyen en su estudio que el intestino de animales sanos es un reservorio de bacterias portadoras de CTX-M, fundamentalmente de *E. coli*, y no se puede descartar la posible transferencia al hombre por la cadena alimentaria.

Existen diversos estudios que caracterizan el tipo de  $\beta$ -lactamasa (*bla*) de espectro extendido en los *E. coli* aislados de pollos.

En España, el primer informe de la detección de BLEE en los animales productores de alimentos se realizó en aislados de *E. coli* recuperado durante el período 2000-2001 a partir de muestras fecales de pollos sanos a nivel matadero obtenida como parte del programa de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos español (Briñas *et al.*, 2003b). En ese estudio, 120 aislados de *E. coli* BLEE se obtuvieron a partir de muestras fecales. Se detectaron CTX-M<sub>-14</sub> y SHV<sub>-12</sub> en el 1,6% de ellos.

Briñas *et al.*, (2005) en un segundo estudio realizado en el 2003 encontraron un aumento en el porcentaje de *E. coli* productoras de BLEE aislados entre aislamientos fecales de pollos sanos con una mayor diversidad de BLEE detectadas. De los 13 *E. coli* aislados, se detectaron enzimas de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en 10 casos y en 5 de ellos fueron combinados con *bla*TEM<sub>-1b</sub>, destacando la presencia de (TEM<sub>-1b</sub>, CTX-M<sub>-14</sub>, CTX-M<sub>-9</sub>, CMY<sub>-2</sub> y SHV<sub>-12</sub>).

Jouini *et al.*, (2007), en Túnez, realizaron un estudio para caracterizar las  $\beta$ -lactamasas de cepas de *E. coli* aisladas de muestras de animales destinados al consumo humano. Realizaron estudios en varios animales y dentro de éstos consideraron como un lote de pollos a un conjunto entre 50 a 60 pollos. En los pollos encontraron, en dos aislados

de *E. coli*  $bla_{CTX-M-1}+ bla_{TEM-1}$  y en otro aislado de pollo  $bla_{CTX-M-14}$  y  $bla_{SHV-5}$  en otro aislado.

Yuan *et al.*, (2009) realizan un estudio sobre *E. coli* productores de  $\beta$ -lactamasas (BLEE) en 14 granjas avícolas diferentes de la provincia de Henan en China, entre diciembre de 2007 agosto de 2008, determinaron la caracterización molecular de los genes  $bla_{BLEE}$  relacionados, incluyendo  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{SHV}$  y  $bla_{CTX-M}$ . Treinta y uno (31) de los 51 aislamientos fueron positivos para un fenotipo BLEE y 29 de estas cepas eran portadoras de una o más genes  $bla$ . Veinte y dos aislamientos genes albergaban  $bla_{TEM}$  y 15 aislamientos s tenían genes  $bla_{CTX-M}$ , uno CTX-M-14, tres CTX-M-24 y 11 de CTX-M-65. Todas las cepas que albergaban  $bla_{CTX-M-24}$  y  $bla_{CTX-M-14}$  y cinco de la  $bla_{CTX-M-65}$  también aislaron el gen  $bla_{TEM-1}$ . Estos autores consideran que es alarmante la elevada prevalencia de genes de resistencia en los pollos de China.

En este mismo país, Li *et al.*, (2010) encontraron en pollos, que dhe 56 cepas productoras de BLEE, 54 aislamientos contenían  $\beta$ -lactamasas de tipo CTX-M incluyendo  $bla_{CTX-M-14}$  (n = 24),  $bla_{CTX-M-65}$  (n = 13),  $bla_{CTX-M-55}$  (n = 10),  $bla_{CTX-M-24}$  (n = 3),  $bla_{CTX-M-3}$  (n = 2),  $bla_{CTX-M-15}$  (n = 1), y  $bla_{CTX-M-64}$  (n = 1). Entre los 54 aislados de *E. coli* que contiene  $bla_{CTX-M}$ , se identificaron 11 grupos de PFGE y 42 patrones de PFGE. Concluyen que sus datos demuestran que el pollo se ha convertido en un importante reservorio de  $bla_{CTX-M}$  en China.

Geser *et al.*, (2011), en un estudio realizado en Suiza sobre prevalencia de *Enterobacteriaceae* BLEE encontraron que en pollos fue del 63,4%, el análisis de PCR reveló que el 71% de estas cepas eran CTX-M-1. En la Figura xx se observa la prevalencia de los diferentes genes  $bla_{BLEE}$  encontrados en enterobacterias aisladas a partir de muestras fecales de pollos de granja en este estudio. Figura37.

Figura 37. Prevalencia de genes de diferentes  $bla_{BLEE}$  aisladas en muestras rectales de pollos de granja en Suiza. Fuente: Geser et al. BMC Veterinary Research 2012



Levestein *et al.*, (2011) en Holanda realizaron un estudio para relacionar cepas aisladas de pacientes con las de pollos sanos de y de carne de pollo. Encontraron que los tipos de cepas en los pollos eran  $bla_{CTX-M-1}$  en el 49% de las muestras,  $bla_{TEM-52}$  en el 29%,  $bla_{SHV-2}$  en el 11%,  $bla_{CTX-M-2}$  en el 9 % y  $bla_{TEM-20}$  en el 3%. Estas mismas  $\beta$ -lactamasas las encontraron en carne de pollo y en humanos pero en porcentajes diferentes. También concluyen que el 19% de *E. coli* BLEE encontrados en los pollos son coincidentes con los de los pacientes.

Existen algunos estudios sobre el tipo de BLEE procedentes de *E. coli* aislados en carne de pollo. Así, Egea *et al.*, (2012) en un estudio realizado en España, en dos períodos de tiempo 2007 y 2010 sobre la prevalencia y características de las BLEE de *E. coli* aisladas de carne de pollos. Ellos encuentra una alta prevalencia de *E. coli* BLEE. Los tipos de BLEE encontradas con más frecuencia fue SHV-12, aunque existió una disminución de la prevalencia desde 2007 a 2010, sin embargo, el tipo CTX-M se había incrementado en el período de tiempo estudiado.

Doi *et al.*, (2010) comparan la prevalencia de *E. coli* BLEE de dos ciudades, una española, Sevilla y otra americana Pittsburgh, y estudian el tipo de BLEE. Ellos encontraron que los tipos más frecuente eran CTX-M y SHV, indicando que la mitad de

los aislados de *E. coli* de la carne de pollo pertenecían a grupos filogenéticamente asociados a *E. coli* extraintestinales muy virulentos.

El referido estudio de Leverstein-van Hall *et al.*, (2012) Realizado en muestras de carne de pollo encontraron las siguientes  $\beta$ -lactamasas:  $bla_{CTX-M-1}$  en el 49%, que también fue la de mayor prevalencia en las muestras de pollos y en las humanas,  $bla_{TEM-52}$  en el 26%,  $bla_{SHV-12}$  en el 16%, ésta no fue encontrada en pollos pero si en humanos,  $bla_{SHV-2}$  en el 4%,  $bla_{CTX-M-2}$  en el 4% y  $bla_{TEM-20}$  en el 1% de las muestras.

### V. 3.

## ***Resistencia de Enterobacterias productoras de $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE) aislados en muestras de pollos***

---

El uso de antimicrobianos en animales productores de alimentos crea una importante fuente de bacterias resistentes a los antimicrobianos que pueden extenderse a los seres humanos a través del suministro de alimentos.

Los antibióticos pueden ser utilizados en la producción animal con fines terapéuticos, para el tratamiento de enfermedades o con fines profilácticos, como control y prevención y esta práctica es importante cuando no es posible tratar a los animales de forma individual (Torres & Zarazaga, 2007). Estas son las condiciones que se dan con frecuencia en las granjas avícolas de cría intensiva de las aves.

La mejora de la gestión del uso de antimicrobianos en los animales productores de alimentos, en particular la reducción del uso de los que son considerados como " muy importante" para la medicina humana, es un paso importante para la preservación de los beneficios de los antimicrobianos para los humanos. En Europa, desde 1998, está prohibido los antibióticos como aditivos en los piensos como promotores de crecimiento en los animales destinados al consumo (Torres & Zarazaga, 2007).

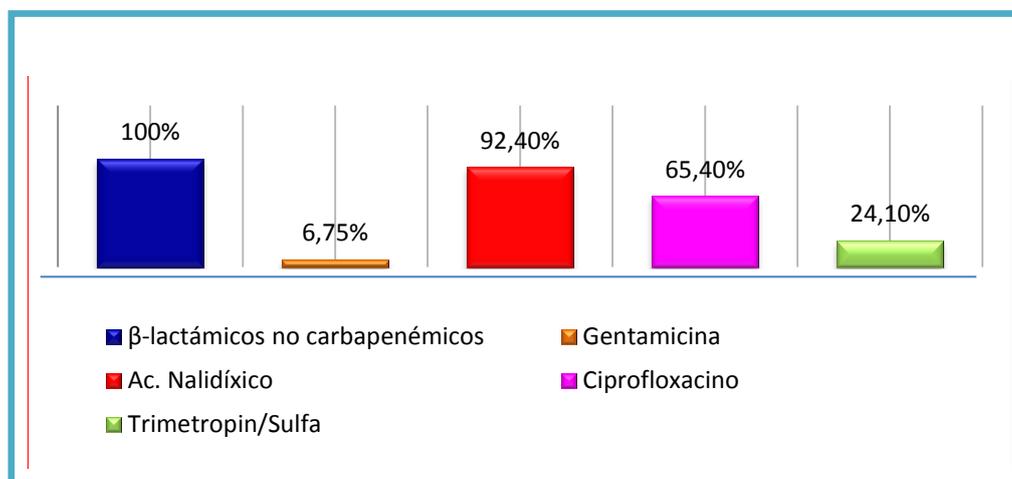
El uso de avoparcina, bacitracina-zinc, espiramicina, virginiamicina y fosfato de tilosina como aditivos para piensos de animales fue prohibido en la Unión Europea en 1998. En otros países, el número de antibióticos disponibles para su uso en las dietas de las aves de corral se encuentra restringido. Los antibióticos se han utilizado en las dietas de las aves de corral durante muchos años como protección contra los patógenos y las enfermedades subclínicas y por el consiguiente aumento del crecimiento. La eliminación de esta medida preventiva ha tenido serias repercusiones en la productividad de las aves y ha impulsado un considerable esfuerzo de investigación cuyo objetivo es encontrar posibles alternativas a los antibióticos, como los probióticos

que proporcionan especies benéficas como lactobacilos y los estreptococos, las proteínas y péptidos antimicrobianos (Lisozima, lactacin), que previenen el crecimiento de bacterias patógenas.

En nuestro estudio las muestras rectales estudiadas proceden de pollos sanos cuya alimentación no contiene ninguna sustancia antimicrobiana en su composición.

El estudio de la resistencia antimicrobiana de estas cepas refleja que los 196 aislados que presentaron un perfil de enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE), muestran resistencia a algunos de los antimicrobianos testados. No se observó resistencia a carbapenémicos ni a las combinaciones de  $\beta$ -lactámicos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas en aislados de *E. coli* ni en *K. pneumoniae*. Sin embargo hemos encontrado resistencia, al resto de  $\beta$ -lactámicos (100%). En aislados de *E. coli* se evidenció resistencia a la gentamicina (6,75%), al cotrimoxazol (24,1%), a las quinolonas (ac. nalidixico) en un porcentaje muy elevado del 92,4% y a ciprofloxacino en un 65,4%. De tres aislados de *K. pneumoniae*, uno evidenció resistencia simultánea a quinolonas y a fluoroquinolonas. En la Figura 38, se aprecia la frecuencia de resistencia en porcentaje observada en *E. coli* aislados en nuestro estudio frente a diferentes grupos de antimicrobianos testados.

Figura 38. Porcentaje de Resistencia Antimicrobiana en *E.coli* BLEE



En las cepas de *E. coli* BLEE se obtuvieron 8 patrones de resistencia diferentes (Tabla 32). El más frecuente fue la resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos no carbapenémicos junto a las quinolonas, ácido nalidíxico y ciprofloxacino. Este patrón de resistencia apareció en el 47,3% de los *E. coli* BLEE de nuestro estudio. Si especificamos según granja, este patrón de resistencia aparece en todas las granjas muestreadas con excepción de la número 2.

Tabla 32. Patrones de resistencia Antibióticos

Nº	Patrones de resistencia Antibióticos	Frecuencia	%
1	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP+ NA+ CIP	112	47.3
2	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + NA	49	20.7
3	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + NA + CIP + SXT	27	11.4
4	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP	15	6.3
5	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + NA + SXT	15	6.3
6	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + GM + NA + CIP + SXT	12	5.0
7	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + GM + NA + CIP	4	1.7
8	AMC+AM + CXM + CXMa + CTX + CAZ + FEP + SXT	3	1.3
	<b>Total</b>	<b>237</b>	<b>100.0</b>

Amoxicilina/Ac.clavulánico: AMC; Ampicilina: AM; Cefuroxima:CXM; Cefuroxima axetil-CXMa  
 Cefoxitina: FOX; Cefotaxima: CTX; ceftazidima: CAZ; Cefepima: FEP; Ertapenem: ETP; Imipenem: IPM;  
 Amikacina: AN; Gentamicina: GM; Ac. Nalidixico: NA; Ciprofloxacino: CIP; Tigeciclina: TGC;  
 Trimetropina/Sulfametoxazol: SXT

El patrón de resistencia que incluye más antibióticos fue el número 6, que contiene la resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos no carbapenémicos junto a las quinolonas, ácido nalidíxico y ciprofloxacino además a la gentamicina y cotrimoxazol. Este patrón de resistencia aparece en el 5% de los aislados de *E. coli* BLEE. Si consideramos por granja, este patrón que incluye resistencia a 10 de los antimicrobianos aparece en el 50% de las granjas.

La aparición de la resistencia a los antimicrobianos de cepas de origen animal y más concretamente de *E. coli* BLEE tiene importantes implicaciones para la salud pública.

El nivel de resistencia a los antimicrobianos de *E. coli* representa un indicador útil de la difusión de la resistencia en poblaciones de bacterias y de la presión selectiva impuesta por los antimicrobianos utilizados en el tratamiento de los seres humanos y de animales productores de alimentos (Sørum *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2005; Alhaj *et al.*, 2007).

Sáenz *et al.*, (2001), demostraron que la frecuencia de resistencia a diferentes agentes antimicrobianos en *E. coli* diferían de acuerdo a la fuente de los aislamientos. Los *E. coli* aislados de voluntarios humanos sanos presentaban una resistencia del 16% y 8% a la ciprofloxacino y gentamicina respectivamente, mientras que los *E. coli* aislados de pollos de engorde presentaban una resistencia mayor a la ciprofloxacino (CIP) (38%) y gentamicina (GM) (40%). Nosotros encontramos resistencias a estos dos antibióticos en porcentajes, superior en el caso de la ciprofloxacino e inferior para el antibiótico gentamicina.

Kikuvi *et al.*, 2007, informaron de que *E. coli* aislados de pollo tenían mayor resistencia que *E. coli* aisladas de cerdos y ganado vacuno.

Geser *et al.*, (2012), encontraron en Suiza que de 62 cepas productoras de *E. coli* BLEE, aisladas de muestras rectales de pollo: 51 eran resistentes a tetraciclina (82.3%), 37 a cotrimoxazol (59,7%), 24 a ácido nalidíxico (38.7%), 6 a aminoglucósido (9.7%), 2 a cloranfenicol (3.2%), 4 a ciprofloxacino (6.5%) y ninguna de las cepas analizadas fue resistente a imipenem. Nosotros encontramos porcentajes de resistencia superiores en el caso de la ciprofloxacino y ácido nalidíxico e inferiores para la gentamicina y cotrimoxazol.

En China, Li *et al.*, (2010), encuentran que de 56 cepas productoras de BLEE, 54 aislamientos contenían  $\beta$ -lactamasas del tipo CTX-M de distintos tipos. Encontraron que más de tres cuartas partes de las cepas productoras de BLEE en pollo también eran resistentes a la ciprofloxacino, porcentaje algo superior al obtenido por nosotros del 65,4%.

Kola *et al.*, (2012), estudiaron en carne de pollo la resistencia a diversos antimicrobianos de *E. coli*, encontrando que el 73,0% eran resistentes a la tetraciclina, el 35,7% a cotrimoxazol y el 7,6% a la ciprofloxacino.

Varios estudios han mostrado que la resistencia a los antimicrobianos de las cepas de *E. coli* aisladas en infecciones humanas fueron causadas por cepas de origen animal y que esos agentes infecciosos albergaban los mismos genes de resistencia móviles que los aislados de diversas fuentes animales.

Así, Johnson *et al.*, (2006) realizaron una comparación molecular y epidemiológica, en Barcelona, España (1996-1998), de 117 aislados de *E. coli* contemporáneos, geográficamente coincidentes, algunos procedentes de seres humanos (35 aislamientos de sangre y 33 de heces) y de los pollos (49 de heces). Algunos eran susceptible ( $n = 57$ ) y otros resistentes ( $n = 60$ ) a ciprofloxacino y los analizaron para conocer su grupo filogenético, el genotipo de virulencia y antígenos O utilizando ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y electroforesis en gel con campo pulsado (PFGE). Sus resultados indicaron que los aislados humanos resistentes eran distintos a los de cepas humanas susceptibles, pero fueron en gran parte indistinguibles de los aislamientos de pollo, mientras que los aislados de pollo resistentes y susceptibles fueron similares. Las cepas humanas susceptibles contenían más genes asociados con la virulencia y con más frecuencia expresan virulencia asociada a antígenos O que lo hicieron las cepas humanas resistentes o cualquier aislamientos de pollo. Ciertas cepas humanas resistentes parecían mucho a los aislados de pollo.

En otro estudio de Johnson *et al.*, (2007), este realizado en USA, investigaron *E. coli* multirresistentes aislados de seres humanos y de aves de corral (pollos y pavos) en Minnesota y Wisconsin y demostraron mediante estudios filogenéticos y de marcadores de virulencia, que los aislados resistentes a los antimicrobianos de los seres humanos eran muy similares a los de las aves de corral, mientras que los aislados susceptible a los antimicrobianos de humanos eran totalmente diferentes a

los de las aves de corral. Los investigadores llegaron a la conclusión de que algunos *E. coli* resistentes aislados de los seres humanos pueden tener su origen en las aves de corral, mientras que las cepas de *E. coli* resistentes aisladas de aves de corral era probable que se obtuvieron a partir de cepas de *E. coli* susceptibles de las aves de corral y que habían adquirido genes de resistencia.

Un estudio similar llevado a cabo por Vieira *et al.*, (2011), mostraron que la resistencia de *E. coli* aisladas muestras sanguíneas humanas, estaba altamente correlacionada con la resistencia en *E. coli* aisladas de muestras de aves de corral y de cerdos. El estudio apoya la hipótesis de que una gran proporción de cepas de *E. coli* resistentes que causan infecciones del torrente sanguíneo en los seres humanos pueden ser de origen alimentario.

Johnson *et al.*, (2012) realizan un estudio para buscar las asociaciones entre la resistencia a múltiples fármacos, contenido plásmido, y el potencial de virulencia entre *E. coli* patógena extraintestinal y comensal en humanos y aves de corral. Ellos concluyen con la evidencia que estas cepas multirresistentes de *E. coli* se han extendido entre las aves de corral y que están asociadas a la adquisición de plásmidos de conjugación.



## ***VI. Conclusiones***

1. Los pollos analizados en nuestro estudio tienen una elevada prevalencia de colonización por Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, superior a los estudios consultados.
2. La mayoría de los aislados productores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido pertenecen a la especie *Escherichia coli* y en un pequeño porcentaje a *Klebsiella pneumoniae*, lo que concuerda con los estudios actuales realizados en animales y en humanos.
3. Todas las granjas aviares de nuestro estudio fueron positivas para la detección de *Escherichia coli* productor de BLEE, siendo todas ellas de sistema de producción intensivo.
4. No se ha encontrado ninguna cepa portadora de la resistencia a carbapenémicos.
5. Se observó en las cepas aisladas de *E. coli* BLEE, 8 patrones de resistencia antibiótica diferentes, siendo el patrón mayoritario el de resistencia conjunta a los  $\beta$ -lactámicos, con excepción de los carbapenémicos, junto a las quinolonas.
6. En todas las granjas estudiadas se aislaron cepas de *Escherichia coli* BLEE con varios patrones de resistencia antibiótica diferentes.
7. Se observó en las cepas aisladas de *K. pneumoniae* BLEE, 2 patrones de resistencia antibiótica diferentes, siendo el patrón mayoritario el de resistencia conjunta a los  $\beta$ -lactámicos, con excepción de los carbapenémicos, junto a las quinolonas.
8. La relación clonal del total de aislados de *E. coli* BLEE de este estudio, establecida por Electroforesis en gel de Campo Pulsante (PFGE), evidenció una gran variabilidad genética dentro de los aislados, obteniéndose 44 patrones de bandas diferentes según los criterios de Tenover.

9. La relación clonal establecida por PFGE de este estudio, evidenció una gran variabilidad genética dentro de los aislados de *K. pneumoniae*, obteniéndose 2 patrones de bandas diferentes según los criterios de Tenover.
10. El tipo molecular de  $\beta$ -lactamasa encontrado con mayor frecuencia fue la enzima CTX-M ( $bla_{CTX-M}$ ). Dentro de esta enzima  $bla_{CTX-M}$  se ha encontrado con mayor frecuencia las pertenecientes al grupo  $bla_{CTX-M-9}$  y al grupo  $bla_{CTX-M-1}$ .
11. La prevalencia de *E. coli* BLEE encontrada es muy elevada y dado que pueden actuar como reservorio de estos microorganismos a nivel comunitario, es necesario que se aumenten las medidas de detección y control en origen de este microorganismo.
12. Se requieren estudios para analizar todos los factores que pueden estar contribuyendo a esta elevada prevalencia de bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en los pollos vivos de las granjas estudiadas, con el objetivo de controlar, si es posible, la selección y diseminación de esta resistencia.



## ***VII. Bibliografía***

1. **Abraham EP, Chain E.** An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 1940; 146: 837-837.
2. **Acar JF.** *Serratia marcescens* infections. *Infect Control*. 1986; 7:273-278.
3. **Actis LA, Tolmasky ME, Crosa JH.** Plásmidos bacterianos: réplica de extracromosómico resistencia genética que codifica para elementos compuestos antimicrobianos. *Biosci*. 1999; 4: 43-62.
4. **Aduino SM, Roy PH, Jacoby GA, Orman BE, Pineiro SA, Centron D.** *bla*<sub>CTX-M-2</sub> is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes Orf513. *Ant Agents Chemother*. 2002; 46:2303-2306.
5. **Aguado García JM, Lumbreras Bermejo C.** Infecciones por enterobacterias. *Medicine*. 1998; 7: 3622-3628.
6. **al Naiemi N, Duim B, Bart A.** A CTX-M de espectro extendido  $\beta$ -lactamasa en *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Med Microbiol*. 2006; 55: 1607-1608.
7. **Alanis AJ.**, Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res*. 2005; 36:697-705.
8. **Alhaj N, Mariana N, Raha A, Ishak Z.** Prevalencia de la resistencia a los antimicrobianos de *Escherichia coli* de diferentes fuentes en Malasia. *Int J Poult Ciencia*. 2007; 6:293-297.
9. **Ambler RP.** The structure of betalactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980; 289:321-331.
10. **Arya M, Shergill IS, Williamson M, L Gommersall, Arya N, Patel SAR.** Principios básicos de la cuantitativa en tiempo real PCR. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005; 5:209-219.
11. **Asensio A, Oliver A, González-Diego P, Baquero F, Pérez-Díaz JC, Ros P, Cobo J, Palacios M, Lasheras D, Cantón R.** Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clin Infect Dis*. 2000; 30-55.

12. **Aubron C, Pore L.** Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, U.S. rivers. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11: 260-264.
13. **Bach SJ, McAllister TA, Veira DM, Gannon VPJ y Holley RA.** La transmisión y el control de *Escherichia coli* O157:H7. *Canadian Journal of Animal Science.* 2002; 82: 475-490.
14. **Baquero F, Reguera JA, Ojeda M, Cantón R, Martínez JL, Martínez Beltrán J.** *Escherichia coli* con resistencia a cefalosporinas de 3ª generación codificada por betalactamasas de tipo plasmídico: primer brote en España. *Rev Esp Microbiol Clin.* 1988; 3:581-582.
15. **Barlow M, Reik RA, Jacobs SD, Medina M, Meyer M, McGowan JE, Tenover FC.** High rate of mobilization for *bla*<sub>CTX-MS</sub>. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14:423-431.
16. **Barnes H, Vaillancourt JP, Gross WP.** Colibacillosis. In *Diseases of Poultry.* Ames. 2003:631-656.
17. **Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966; 45:493-496.
18. **Bauernfeind A, Grimm H, y Schweighart S.** Un nuevo cefotaximasa plasmídico en una clínica aislar de *Escherichia coli*. *Infección.* 1990; 18:294-298.
19. **Baum von H, Marre R.** Resistencia a los antimicrobianos de *Escherichia coli* y las implicaciones terapéuticas. *Int J Med Microbiol.* 2005; 295:503-511.
20. **Beery JT, Doyle MP, and Schoeni JL.** Colonization of chicken cecae by *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl Environ Microbiol.* 1985; 310-315.
21. **Bélanger L, Garenaux A, Harel J, Boulianne M, Nadeau E, Dozois CH.** *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. Article first published online: 24 MAR 2011 DOI: 10.1111/j.1574-695X.2011.00797.
22. **Bell BP, Goldoft M, Griffin PM.** A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers the Washington experience. *JAMA.* 1994; 272:1349-53.

23. **Ben-Ami R, Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwartz D, Giladi M, Chmelnitsky I, Leavitt A, Carmeli Y.** Influx of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* into hospital. *Clin Infect Dis.* 2006; 42:925-934.
24. **Bennett P M.** Genome plasticity: insertion sequence elements, transposons and integrons, and DNA rearrangement. *Methods Mol Biol.* 2004; 266:71-113.
25. **Bennett PM.** Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol.* 2008; 153:347-57.
26. **Bergenholtz RD, Jorgensen MS, Hansen LH, Jensen LB and Hasman H.** Characterization of genetic determinants of extended-spectrum cephalosporinases (ESCs) in *Escherichia coli* isolates from Danish and imported poultry meat. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64:207-209.
27. **Bertona E, Radice M, Rodríguez C, Barberis C, Vay C, Famiglietti A.** Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia enzimática a las cefalosporinas de tercera generación en *Enterobacter* spp. *Rev argent microbiol.* 2005; 37:203-208.
28. **Beutin L, Geier D, Steinruck H, Zimmermann S, Scheutz F.** Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like-toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol.* 1993; 2483-2488.
29. **Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, Peters G, Karch H.** Characterization of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uremic syndrome in Germany, 2011 a microbiological study. *Lancet Infect Dis.* 2011; 11:671-677.
30. **Black RE, Brown KH, Becker S, Alim AR, Merson MH.** Contamination of weaning foods and transmission of enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea in children in rural Bangladesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1982; 76:259.
31. **Blanc V, Mesa R, Saco M, Lavilla S, Prats G, Miró E, Navarro F, Cortés P, Llagostera M.** ESBL-and plasmidic class C  $\beta$ -Lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Veterinary Microbiology.* 2006; 118:299-304.

32. **Blanco J, Alonso MP, Blanco M, Gonzalez E A.** Mecanismo de patogénesis de los *Escherichia coli* causantes de infecciones extraintestinales. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1991; 6:163-176.
33. **Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Alonso MP, González E A, and Bernárdez MI.** Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*. *Manual de Microbiología Veterinaria*, S. Vadillo, S. Píriz and E. Mateos. 2002; 21: 301-325.
34. **Blanco J, Blanco M, Mora A, and Blanco J.** Production of toxins (enterotoxins, verotoxins and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity. *J Clin Microbiol.* 1997b; 2956-2957.
35. **Blanco J, Blanco M, Mora A. and Blanco J.** Prevalence of Bacterial Resistance to quinolones and other antimicrobials among Avian *Escherichia coli* Strain isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. *J Clin Microbiol.* 1997a; 2184-2185.
36. **Blanco JE, Blanco M, Mora A, Cansen W, García V, Vázquez M, Blanco J.** Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicaemic chickens in Galicia (Northwest Spain). *Vet Microbiol.* 1998; 61: 229-235.
37. **Blanco JE, Blanco M, Mora A, Croas C, Blanco J.** *Escherichia coli* septicémicos aviáres: problemática en España. *Vet Microbiol.* 1996c; 13: 680-686.
38. **Blanco M, Blanco J, Blanco JE, Ramos J.** Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. *American J Vet Research.* 1993, 54: 1446-1451.
39. **Blanco M, Blanco JE, Blanco J, Gonzalez EA, Alonso MP, Maas H, Jansen WH.** Prevalence and characteristics of human and bovine verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated in Galicia (north-western Spain). *European J of Epidemiology.* 1996b; 12: 13-19.
40. **Blanco M, Blanco JE, Mora A, Blanco J.** *Escherichia coli* septicémicos aviáres: serotipos, factores de virulencia, resistencia a antibióticos y desarrollo de vacunas. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Veterinaria. *Vet Microbiol.* 1996; 13: 525-537.

41. **Bonfiglio G, Laksai Y, Franceschini N, Perilli M, Segatore B, Bianchi C, Stefani S, Amicosante G, Nicoletti G.** In vitro activity of piperacillin/tazobactam against 615 *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in intensive care units. *Chemotherapy*. 1998; 44:305-312.
42. **Bonnet C, Diarrassouba F, Brousseau R, Masson L, Topp E, Diarra MS.** Pathotype and antibiotic resistance gene distributions of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens raised on antimicrobial-supplemented diets. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75:6955-6962.
43. **Bonnet R, Sampaio JLM, Labia R, De Campos C, Sirot D, Chanal C, y Sirot J.** A CTX-M  $\beta$ -lactamase novel (CTX-M-8) en la cefotaxima resistente enterobacterias aisladas en Brasil. *Antimicrob. Agentes Chemother*. 2000; 44:1936-1942.
44. **Bonnet R.** Growing group of extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48:1-14.
45. **Bortolaia V, Larsen J, Damborg P, Guardabassi L.** Potential Pathogenicity and Host Range of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* isolates from Healthy Poultry. *Appl. Environ. Microbiol*. 2011; 77:5830-5833.
46. **Bottone EJ.** *Yersinia enterocolitica*: The charisma continues. *Clin Microbiol Rev*. 1997; 10: 257-276.
47. **Bradford PA.** Extended-spectrum beta-lactamases in the 21<sup>st</sup> century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14: 933-951.
48. **Briñas L, Moreno MA, Zarazaga M, Porrero C, Saenz Y, García M, Domínguez L, y Torres C.** La detección de CMY-2, CTX-M-14 y SHV-12 beta-lactamasas de *Escherichia coli* fecal muestras aisladas de pollos sanos. *Antimicrob Agentes Chemother*. 2003; 47: 2056-2058.
49. **Briñas L, Moreno MA, Teshager T, Sáenz Y, Porrero MC, Domínguez L, Torres C.** Monitoring and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49:1262-1264.

50. **Briñas L.** Caracterización genética de beta-lactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* de origen animal, humano y alimentario. Tesis Doctoral, Universidad de La Rioja, 2005.
51. **Brisson-Noel A, Arthur M, Courvalin P.** Evidence for natural gene transfer from gram-positive cocci to *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1988; 170:1739-1745.
52. **Buckles EL, Wang X, Lane MC.** The role of K2 capsule in *Escherichia coli* urinary tract infection and serum resistance. *J Infect Dis.* 2009; In Press
53. **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39:1211-1233.
54. **Bush K, Jacoby GA.** Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 969-976.
55. **Bush K, Jacoby GA., and Medeiros AA.** Functional Classification Scheme for  $\beta$ -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1995; 39:1211–1233.
56. **Bush K.** Classification of: groups 1, 2a, and 2b'. *Ant Agents Chemother .* 1989; 33:259-270.
57. **Bush, K.** Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33: 259-63.
58. **Bush, K.** Classification of beta-lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33: 271-6.
59. **Calderón ER, Yagui MM, Sacsquispe CR.** Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de difusión disco. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2002.
60. **Campos J, Baquero F.** Resistencia a antibióticos: ¿qué hacer ahora? *Med Clin.* 2002; 119:656-658.
61. **Cantón R, González-Alba JM, Galán JC.** CTX-M enzymes: origin and diffusion *Front. Microbiol.* 02 April 2012 | doi: 10.3389/fmicb.2012.00110.

62. **Cantón R, Alós JI, Baquero F, Calvo J, Campos J, Castillo J, Cercenado E, Domínguez MA, Liñares J, LópezCerezo L, Marco F, Mirelis B, Morosini MI, Navarro F, Oliver A, Pérez-Trallero E, Torres C, Martínez-Martínez L.** Grupo de Consenso de Recomendaciones para Selección de Antimicrobianos y Concentraciones en Estudio de Sensibilidad in vitro con Sistemas Automáticos y Semiautomáticos. Recomendaciones para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad in vitro con sistemas automáticos y semiautomáticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007; 25:394-400.
63. **Cantón R, Coque TM.** The CTX-M  $\beta$ -Lactamase pandemic. *Current Opinion Microbiol.* 2006; 9: 466-475.
64. **Canton R, Oliver A, Coque TM, Varela MC, Pérez-Díaz JC, Baquero F.** Epidemiology of extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a twelve-year period. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:1237–1243.
65. **Cantón R., Ruiz-Garbajosa P.** Co-resistencia: una oportunidad para que las bacterias y los genes de resistencia. *Curr Opin Pharmacol.* 2011; 11: 477-485.
66. **Carattoli A.** Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 1: 117-123.
67. **Chaibi EB, Sirot D.** Inhibitor-resistant TEM beta-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics." *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 447-58.
68. **Chaibi EB, Farzaneh S.** An additional ionic bond suggested by molecular modelling of TEM-2 might induce a slight discrepancy between catalytic properties of TEM-1 and TEM-2 beta-lactamases. *FEMS Microbiol.* 1996; 143: 121-125.
69. **Chaibi EB, Sirot D, Paul G, Labia R.** Inhibitor-resistant TEM  $\beta$ -lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J Antimicrob Chemoter.* 1999; 43:447-458.

70. **Christa Ewers, Esther-Maria Antão, Ines Diehl, Hans-C, Philipp and Lothar H. Wieler.** Intestine and Environment of the Chicken as Reservoirs for Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains with Zoonotic Potential. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75:184-192.
71. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth informational supplement M100-S19. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2009.
72. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, PA. 2010.
73. **Cohen ML.** Epidemiology of drug resistance. Implications for a post antimicrobial. *Science.* 1992; 257:1050-1055.
74. **Collatz E, Labia R.** Molecular evolution of ubiquitous betalactamases towards extended-spectrum enzymes active against newer beta-lactam antibiotics. *Mol Microbiol.* 1990; 4: 1615-1620.
75. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2010. (Edition de Janvier 2010). (<http://www.sfm.asso.fr/publi/general.php?pa=1>).
76. **Cortes MC.** El ganado caprino como reservorio de bacterias enteropatógenas potencialmente zoonóticas. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, UCM, 2007.
77. **Cortés P, Blanc V, Mora A, Dahbi G, Blanco JE, Blanco.** Aislamiento y caracterización de posibles patógenos resistentes a los antimicrobianos de *Escherichia coli* cepas provenientes de granjas de pollos y cerdos en España. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76: 2799-2805.
78. **Costa D, Poeta P, Sáenz Y, Vinué L, Rojo-Bezares B, Jouini A.** Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 59:1311-1312

79. **Costa D, Vinué L, Poeta P, Coelho AC, Matos M, Sáenz Y, Somalo S, Zarazaga M, Rodrigues J, Torres C.** Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Vet Microbiol.* 2009; 18138:339-344.
80. **Crowley B, Beneti VJ, Domenech-Sánchez A.** Expression of SHV<sub>2</sub> beta-lactamasas and of reduced amounts of OmpK36 porin in *Klebsiella pneumoniae* results in increased resistance to cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob agent's chemother.* 2002; 46:3679-3682.
81. **Csewell MW, Phillipps I.** Aspects of plasmid-mediated antibiotic resistance and epidemiology of *Klebsiella* species. *Am J Med.* 1981; 70:459-462.
82. **Davies, RH.** Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: assessment of methodology. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:3609-3616.
83. Departamento de Salud y Servicios Humanos de Alimentos y Medicamentos. Administración de Seguridad de Alimentos: Manual para el uso voluntario de los principios de HACCP para Operadores de Servicio de Alimentos y establecimientos minoristas. Centro para la Seguridad Alimentaria y la Nutrición Aplicada de EE.UU. Abril de 2006. Archivado desde el original en 2007-06-07.
84. **Dho-Moulin M, Schouler C, Tailliez P, Kao Mu-Rong, Bree A, Germon P, Oswald E, Mainil J, Blanco M, and Blanco J.** Common Virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *J Clin Microbiol.* 2006; 3484-3492.
85. **Dho-Moulin M.** Les *Escherichia coli* pathogènes des volailles. *Annales de Médecine Vétérinaire.* 1993; 137: 353-357.
86. **Dhondt A, Dhondt K, Hawley D, Jenelle C.** Experimental evidence for transmission of *Mycoplasma gallisepticum* in house finches by fomites" Avian *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Applied and Environmental Microbiology.* 1985; 313-315.

87. **Díaz MA, Hernández JR, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño, Alvaro Pascual A.** Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; 27:503–510..
88. **Dierikx C, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Smith H, Mevius D.** Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet Microbiol*. 2010; 145:273-278.
89. **Dierikx CM, Fabri T, Goot JA.** Prevalence of Extended-Spectrum- Beta-Lactamase producing *E. coli* isolates on broiler farms in The Netherlands. Scientific spring meeting of the Dutch Society for Medical Microbiology and the Dutch Society for Microbiology. Arnhem: Ned Tijdschr. *Med Microbiol*. 2010; 18:28-29.
90. **Dierikx C, van der Goot J, Fabri T, van Essen-Zandbergen A, Smith H, Mevius D.** Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase- and AmpC- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68:60-67.
91. **Doi Y, Paterson DL, Egea P, Pascual A, López-Cerero L, Navarro MD, Adams-Haduch JM, Qureshi ZA, Sidjabat HE, Rodríguez-Baño J.** Extended-spectrum and CMY-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2010; 16:33-38.
92. **Dozois CM, Dho-Moulin M, Bree A, Fairbrother JM, Desautels C, Curtiss R.** 3rd, Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infection and immunity*. 2000; 68: 4145-4154.
93. **Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V.** Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14: 21-24.
94. **Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V.** Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14:90-103.

95. **Dsy WA, Maurelli AT.** *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* paradigm for pathogen evolution and host-parasite interactions. In: Donnenberg MS, editor. *Escherichia coli. Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen*. San Diego: Academic Press. 2002; 209-237.
96. **Duan RS, Sit THC, Wong SSY, Wong RCW, Chow KH, Mak GC.** *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases in food animals in Hong Kong. *Microb Drug Res* 2006; 12:145-148.
97. **Egea P, López-Cerero L, Torres E, Gómez-Sánchez Mdel C, Serrano L, Navarro Sánchez-Ortiz MD, Rodríguez-Baño J, Pascual A.** Increased raw poultry meat colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the south of Spain. *Int J Food Microbiol*. 2012; 159:69-73.
98. **Enoch DA, Brown F, Sismey AW, Mlangeni DA, Curran MD, Karas JA, Cone DB, Aliyu SH, Dhanji H, Doumith M, Maharjan S, Meunier D, Woodford N.** Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a UK district hospital; an observational study. *J Hosp Infect*. 2012; 270-277.
99. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (EUCAST) 2011. (<http://www.eucast.org>).
100. European Food Safety Authority. (EFSA Journal). 2011; 9:2190.
101. **Ewers C, Janben T, Kiebling, S, Philipp HC, Wieler LH.** Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia en poultry. *Vet Microbiol*. 2004; 104: 91-101.
102. **Ewers C, Anta E, Diehl I, Philipp HC, and Wieler LH.** Intestine and Environment of the Chicken as Reservoirs for Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains with Zoonotic Potential. American Society for Microbiology. 2009; 75:184-192.
103. **Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:646-655

104. **Fairley KF, Carson NE, Gutch RC.** Site of infection in acute urinary-Tract infection in general practice. *Lancet*. 1971; 9:615-618.
105. **Famiglietti A, Quinteros M, Vázquez M, Marín M, Nicola F, Radice M.** Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en *Enterobacteriaceae*. *Rev Arg Microb*. 2005; 37:57-66.
106. **Farmer JJ, McWhorter AC, Brenner DJ, Morris GK.** The *Salmonella* Arizona group of *Enterobacteriaceae*: nomenclature classification and reporting. *Clin Microbiol News*. 1984; 6:63.
107. **Farmer JJ.** *Enterobacteriaceae*: introduction and identification. En: Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, *et al*, editors. Washington, DC: ASM Press. 1995; 438.
108. **Fernández-Rodríguez A, Reguera JA, Pérez-Díaz JC, Picazo JJ, Baquero F.** Primera epidemia española de resistencia plasmídica a cefalosporinas de tercera generación: implicación de SHV-2. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1992; 10:456–461.
109. **Frere, JM. Galleni M.** Is it necessary to change the classification of {beta}-lactamases? *J Antimicrob Chemother*. 2005; 55: 1051-1053.
110. **Frost LS, Laplace R, Summers AO, Toussaint A.** Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol*. 2005; 3:722-732.
111. **Frost LS, Leplae R, Summers AO y Toussaint A.** Elementos genéticos móviles: los agentes de la evolución de código abierto. *Rev. Microbiol*. 2005; 3: 722-732.
112. **Garaizar J, López-Molina N, Laconcha I, Baggesen D, Rementeria A, Vivanco A, Audicana A, Perales I.** Suitability of PCR fingerprinting, infrequent restriction-site PCR, and *Pulsed-field gel electrophoresis*, combined with computerized gel analysis, in library typing of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000; 66: 5273-5281.
113. **García J, M Fresnadillo, Arce J, y García E.** Antibióticos  $\beta$ -lactámicos: concepto y clasificación. *Medicine*. 1998; 88:4109-4115.

114. **García J, M Fresnadillo Arce J, y García E.** Antibióticos  $\beta$ -lactámicos. En: García Sánchez J, Lopéz R, Prieto J., Editores. Antimicrobianos en medicina. *Barcelona Sociedad Española de Quimioterapia/Prous science*. 1999; 213-226.
115. **García-Hernández AM, García-Vázquez E, Hernández-Torres A, Ruiz J, Yagüe G.** Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Rev Esp Quimioter* 2011; 24:57-66.
116. **Gardner P, Smith DH, Beer H.** Recovery of resistance factors of a drug-free community. *Lancet*. 1969; 2:774-776.
117. **Gazouli M, Tzelepi Sidorenko SV, Tzouvelekis LS.** Sequence of the gene encoding a plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase (CTX-M-4): involvement of serine 237 in cephalosporin hydrolysis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42: 1259-1262.
118. **George DB, Manges AR.** Una revisión sistemática de estudios de brotes y la no-aparición de patógenos extraintestinales *Escherichia coli* causantes de infecciones adquiridas en la comunidad. *Epidemiology Infect*. 2010; 138: 1679-1690.
119. **Geser N, Stephan R, Kuhnert P, Zbinden R, Kaeppli U, Cernela, Haechler HJ.** Carro fecal de espectro extendido *Enterobacteriaceae*  $\beta$ -lactamasa que producen en los cerdos y el ganado en masacre en Suiza. *Food Prot*. 2011; 74:446-449.
120. **Geser N, Roger Stephan R, Herbert Hächler H.** Occurrence and characteristics of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk Geser *et al*. *BMC Veterinary Research* 2012; 8:21
121. **Gniadkowski M, Schneider I, Palucha A, Jungwirth R, Mikiewicz B, y Bauernfeind A.** Resistentes a cefotaxima *Enterobacteriaceae* aislados de un hospital en Varsovia, Polonia: identificación de un nuevo CTX-M-3-cefotaxima hidrolizar  $\beta$ -lactamasa que está estrechamente relacionado con la enzima CTX-M-1/MEN-1. *Antimicrob. Agentes Chemother*. 1998; 42: 827-832.

122. **Gobernado M.** Betalactamasas de espectro extendido en aumento. *Rev Esp Quimioterap.* 2005; 18:115-117.
123. Gregova G, Kmetova M, Kmet V, Venglovsky J, Feher A. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from a poultry slaughterhouse. *Ann Agric Environ Med.* 2012; 19:75-77.
124. **Griffin PM, Ostroff SM, Tauxe RV.** Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections a broad clinical spectrum. *Ann Intern Med.* 1988; 109; 705-712.
125. **Gross WG.** Diseases due to *Escherichia coli* in poultry in: Gyles C. L. (Ed), *Escherichia coli* in domestic animals and humans, *CAB International, Wallingford.* 1994; 237-259.
126. **Gupta K, Hillier SL, Hooton TM.** Effects of contraceptive method on the vaginal microbial flora: prospective evaluation. *J Infect Dis.* 2000; 185:595-601.
127. **Gupta, V.** An update on newer beta-lactamases. *Indian J Med Res.* 2007; 126: 417-427
128. **Gyles, GL.** Pathogenesis of bacterial infections in animals, 2nd ed., Iowa State University Press, Ames. 1993; 164-187.
129. **Haeggman S, Löfdahl S, Burman LG.** An allelic variant of the chromosomal gene for class A beta-lactamase K<sub>2</sub>, specific for *Klebsiella pneumoniae* is the ancestor of SHV<sub>-1</sub>. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41:2705-2709.
130. **Hammerum AM, Heuer OE.** Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clin Infect Dis.* 2009; 48:916-921.
131. **Hansen DS, Gottschau A, Kolmos HJ.** Epidemiology of *Klebsiella* bacteraemia: a case control study using *Escherichia coli* bacteremia as control. *J Hosp Infect.* 1998; 38:119.
132. **Hanson, ND y CC Sanders.** Regulación de la expresión inducible AmpC beta-lactamasa entre *Enterobacteriaceae*. *Curr. Pharm. Diseño.* 1999; 5: 881-894.
133. **Hawkey PM.** The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ.* 1998; 317:657-660.

134. **Healy M, Huong J, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S.** Microbiol DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 199-207.
135. **Hernández JR, Pascual A, Canton R, Martínez-Martínez L.** Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria GEIH. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIHBLEE 2000). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003; 21:77-82.
136. **Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, y Whittam TS.** Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1990; 172:6175-6181.
137. **Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D.** In vitro activities of the beta-lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with beta-lactams against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:1586-1592.
138. **Ho, PL, Terence KM, Cheung M, Yam WC, Yuen KY.** Caracterización de una variante de laboratorio generados de BPS  $\beta$ -lactamasa de *Burkholderia pseudomallei* que hidroliza ceftazidima. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 50: 723-726
139. **Hodge W, Ciak J, Tramont EC.** Simple method for detection of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol.* 1978; 7:102-103.
140. **Högenauer C, Langner C, Beubler E.** *Klebsiella oxytoca* as a causative organism of antibiotic-associated hemorrhagic colitis. *N Engl J Med.* 2006; 355:418-426.
141. **Hornick RB, Greisman SE, Woodward TE, DuPont HL, Dawkins AT, Snyder MJ.** Typhoid fever: pathogenesis and immunologic control. *N Engl J Med* 1970; 283:686.
142. **Hornish RE, Kotarski SF.** Cephalosporins in veterinary medicine. Ceftiofur use in food animals. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* 2002; 2:717-31.

143. **Horton RA, Randall LP, Snary EL, Cockrem H, Lotz S, Wearing H, Duncan D, Rabie A, McLaren I, Watson E, La Ragione RM, Coldham NG.** Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum {beta}-lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77:3715-3719.
144. **Horwitz MA, Silverstein SC.** Influence of the *Escherichia coli* capsule on complement fixation and on phagocytosis and killing by human phagocytes. *J Clin Invest.* 1980; 65:82-94.
145. **Humeniuk C, Arlet G, Gautier V.**  $\beta$ -Lactamases of *kluuvera ascorbata* , probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:3045-3049.
146. **Huovinen P, Huovinen S.** Sequence of PSE-2 beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988; 32: 134-136.
147. **Iguchi A, Osawa R, Kawano J, Shimizu A, Terajima J, and Watanabe H.** Effect of repeated subculturing and prolonged storage at room temperature of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on Pulsed-Field Gel Electrophoresis profiles. *J Clin Microbiol.* 2002; 3079-3081.
148. **Jacoby GA, Muñoz-Price SL.** The new beta-lactamases. *N Engl J Med.* 2005; 352:380-391.
149. **Jain R, Rivera MC, Moore JE, Lake JA.** Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. *Mol Biol Evol.* 2003; 20:1598-1602.
150. **Jakobsen L, Garneau P, Bruant G, Harel J, Olsen SS , Porsbo LJ.** Es *Escherichia coli* infección del tracto urinario una zoonosis? Prueba de enlace directo con los animales de producción y de la carne. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31; 1121-1129.
151. **Janda JM, Abbott S.L.** The genus *Hafnia*: from soup to nuts. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19:12-18.
152. **Janda JM, Abbott SL.** Infections associated with the genus *Edwardsiella*: the role of *Edwardsiella tarda* in human disease. *Clin Infect Dis.* 1993; 17:42-48.

153. **Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A.** Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* 1988; 10:867-878.
154. **Jay MT, Cooley M, Carychao D.** *Escherichia coli* O157:H7 in feral swine near spinach fields and cattle, central California coast. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13:1908-1911.
155. **Jean, SS, Hsueh, PR, Lee, WS, Chang, HT, Chou, MI, Chen, es decir, Wang, JH, Lin, CF, Shyr, JM y otros autores.** vigilancia nacional de la resistencia antimicrobiana entre *Enterobacteriaceae* en unidades de cuidados intensivos en Taiwán. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009; 28, 215 -220.
156. **Jensen LB, Hasman H, Agero Y, Emborg HD, Aarestrup FM.** First description of an oxyimino-cephalosporin-resistant, ESBL-carrying *Escherichia coli* isolated from meat sold in Denmark. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57:793-794.
157. **Johanson WG, Pierce AK, Sanford JP.** Changing pharyngeal bacterial flora of hospitalized patients: emergence of gram-negative bacilli. *N Engl J Med.* 1969; 28:1137-1140.
158. **Johnson JR, Russo TA.** Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: The other bad *E. coli*. *J Lab Clin Med.* 2002; 139:155-162.
159. **Johnson TJ, Skyberg J, and Nolan LK.** Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from an *Escherichia coli* isolate incriminated in avian colibacillosis. *Avian Diseases.* 2004; 48: 351-360.
160. **Johnson JR, Kuskowski MA, Smith K, O'Bryan TT, Tatini.** resistentes a los antibióticos y extraintestinal patógenas de *Escherichia coli* en los alimentos al por menor. *J Infect Dis.* 2005; 191: 1040-1049.
161. **Johnson JR, Delavari P, O'Bryan TT, Smith KE, Tatini S.** Contamination of retail foods, particularly turkey, from community markets (Minnesota, 1999–2000) with antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis* 2005; 2:38-49.

162. **Johnson JR, Kuskowski MA, Menard M, Gajewski A, Xercavins M, Garau J.** Similitud entre humanos y pollo *Escherichia coli* aislados en relación al estado de resistencia a la ciprofloxacina. *J Infect Dis.* 2006; 194:71-78.
163. **Johnson TJ, Johnson SJ, and Nola, LK.** DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *Journal of Bacteriology.* 2006a; 745-758.
164. **Johnson JR, Clermont O, Kuskowski M, Menard M, Picard B, and Denamur E.** Experimental Mouse Lethality of *Escherichia coli* Isolates, in Relation to Accessory Traits, Phylogenetic Group, and Ecological Source. *J Infect Dis.* 2006b; 194: 1141-1150.
165. **Johnson JR, Sannes MR, Croy C, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA.** Resistentes a los fármacos antimicrobianos de *Escherichia coli* de humanos y productos de aves de corral, Minnesota y Wisconsin, 2002-2004. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13: 838-846.
166. **Johnson TJ, Wannemuehler Y, Johnson SJ, Stell AL, Doetkott C, Johnson JR, Kim KS, Spanjaard L, Nolan LK.** Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74:7043–7050.
167. **Johnson, J, McCabe J, White D, Johnston B, Kuskowski M & McDermott P.** Análisis molecular de *Escherichia coli* de carnes al por menor (2002-2004) del Sistema de Monitoreo Nacional de Estados Unidos resistencia a los antimicrobianos. *Clin Infect Dis.* 2009; 49:195-201.
168. **Johnson TJ, Logue CM, Johnson JR, Kuskowski MA, Sherwood JS, Barnes HJ, DebRoy C, Wannemuehler YM, Obata-Yasuoka M, Spanjaard L, Nolan LK.** Associations between multidrug resistance, plasmid content, and virulence potential among extraintestinal pathogenic and commensal *Escherichia coli* from humans and poultry. *Foodborne Pathog Dis.* 2012; 9:37-46.
169. **Joklik WK.** The story of penicillin: the view from Oxford in the early 1950s. *FASEB J.* 1996; 10: 525-528.

170. **Jouini A, Vinué L, Slama KB, Sáenz Y, Klibi N, Hammami S, Boudabous A, Torres C.** Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60:1137-1141.
171. **Junying Ma, Jian-Hua Liu, Luchao Lv, Zhiyong Zong, Yan Sun, Hongqing Zheng, ZhangLiu Chen and Zhen-Ling Zeng.** Characterization of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Genes Found among *Escherichia coli* Isolates from Duck and Environmental Samples Obtained on a Duck Farm. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78:3668-3673.
172. **Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL.** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2:123-140.
173. **Kaper JB.** Pathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol* 2005; 295:355-356.
174. **Kapperud G.,** *Yersinia enterocolitica* in food hygiene. *Int J Food Microbiol.* 1991; 12:53.
175. **Karim A, Poirel L, Nagarajan S, y Nordmann P.** Mediada por plásmidos de amplio espectro  $\beta$ -lactamasa (CTX-M-3 similar) de la India y de asociación del gen con secuencia de inserción IS ECP1. *FEMS Microbiol.* 2001; 201: 237-241.
176. **Kariuki S, Cheesbrough J, Mavridis, A K, Hart CA.** Typing of Salmonella enterica serotype Paratyphi C isolates from various countries by plasmid profiles and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 1999b; 37: 2058-2060.
177. **Kariuki S, Gilks C, Kimari J, Obanda A, Muyodi J, Waiyaki P, & Hart A.** Genotype analysis of *Escherichia coli* strains isolated from children and chickens living in close contact. *Applied and Environmental Microbiology.* 1999a; 472-476.
178. **Karmali MA.** Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews.* 1989; 2:15-38.
179. **Kawano M, Yaguchi K, & Osawa R.** Genotypic analyses of *Escherichia coli* isolated from chicken with colibacillosis and apparently healthy chickens in Japan. *Microbiology and Immunology.* 2006; 50: 961-966.

180. **Kawano M, Yaguchi K, a Osawa R.** Genotypic analyses of *Escherichia coli* isolated from chicken with colibacillosis and apparently healthy chickens in Japan. *Microbiology and Immunology*. 2006; 50 : 961-966.
181. **Kikvi GM, Schwarz S, Ombui JN, Mitema ES, Kehrenberg C.** Estreptomicina y genes de resistencia a cloranfenicol en *Escherichia coli* aisladas de ganado bovino, porcino y pollo en Kenia. *Microb. Resista Drogas*. 2007; 13: 62-68.
182. **Kliebe C, Nies BA, Meyer SF, Tolxdorff-Neutzling RM y Wiedeman B.** Evolución de la resistencia plásmido codificado a cefalosporina de amplio espectro Antimicrob. *Agentes Chemother*. 1985; 28:302-307.
183. **Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S.** Transferable resistance to cefotaxime, ceftioxin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. 1983; 11:315-7.
184. **Knox JR.** De espectro extendido y resistente a los inhibidores de tipo  $\beta$ -lactamasas TEM: mutaciones, especificidad, y la estructura de tres dimensiones. *Antimicrob. Agentes Chemother*. 1995; 39: 2593 -2601.
185. **Ko WC, Paterson DL, Sagnimeni AJ, Hansen DS, Von Gottberg A, Mohapatra S.** Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8:160.
186. **Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P.** Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in nutshell. *Mol Microbiol*. 2000; 37:239-253.
187. **Kojima A, Ishii Y, Ishihara K, Esaki H, Asai T, Oda C.** Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49:3533-3537.
188. **Kola A, Kohler C, Pfeifer Y, Schwab F, Kühn K, Schulz K, Balau V, Breitbach K, Bast A, Witte W, Gastmeier P, Steinmetz I.** High prevalence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in organic and conventional retail chicken meat, Germany. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67:2631-2634.

189. **Korzeniewska E, Harnisz M.** Beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in hospital effluents. *J Environ Manage.* 2013;123:1-7
190. **Kratz A, Greenberg D, Barki Y, Cohen E, Lifshitz M.** *Pantoea agglomerans* as a cause of septic arthritis palm tree thorn injury; case report and literature review. *Arch Dis Child.* 2003; 88: 542-544.
191. **La Ragione RM and Woodward MJ.** Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticemia. *Research in Veterinary Science* 2002; 73: 27-35.
192. **Lavilla S, Gonzalez-López J.** Prevalence of qnr genes among extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61: 291-295.
193. **Lederberg J.** Infectious history. *Science* 2000; 288:287-293.
194. **Lefon-Guibout V, Speldooren V, Heym B.** Epidemiological survey of amoxicillin-clavulanate resistance and corresponding molecular mechanisms in *Escherichia coli* isolates in France: New genetic features of blaTEM genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 2709-2014.
195. **Leverstein-van Hall MA, Blok HEM, Donders AR.** Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrins and is independent of species or isolate origin. *J infect Dis.* 2003; 187:251-259.
196. **Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Cohen Stuart J, Voets GM, van den Munckhof MP, van Essen-Zandbergen A, Platteel T, Fluit AC, van de Sande-Bruinsma N, Scharinga J, Bonten MJ, Mevius DJ.** Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. National ESBL surveillance group. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17:873-880.
197. **Li J, Ma Y, Hu C, Jin S, Zhang Q, Ding H, Ran L, Cui S.** Dissemination of cefotaxime-M-producing *Escherichia coli* isolates in poultry farms, but not swine farms, in China. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7:1387-1392

198. **Li L, Jiang ZG, Xia LN, Shen JZ, Dai L, Wang Y, Huang SY, Wu CM.** Characterization of antimicrobial resistance and molecular determinants of beta-lactamase in *Escherichia coli* isolated from chickens in China during 1970-2007. *Veterinary Microbiology*. 2010; 144: 505-510.
199. **Li XZ, Mehrotra M, Ghimire S, Adewoye L.**  $\beta$ -Lactam resistance and  $\beta$ -lactamases in bacteria of animal origin. *Vet Microbiol*. 2007; 121:197-214.
200. **Liébana E, Guns D, García-Migura L, Woodward MJ, Clifton-Hadley F, Davies R H.** Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: assessment of methodology. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 3609-3616.
201. **Liébana E, Guns D, García-Migura L, Woodward MJ, Clifton-Hadley F, Davies RH.** Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: assessment of methodology. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 3609-3616.
202. **Lim D, Strynadka NC.** Structural basis for the beta lactam resistance of PBP<sub>2a</sub> from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Struct Biol*. 2002; 9:870-876.
203. **Lipsky BA, Hook EW III, Smith AA.** *Citrobacter* infections in humans: experience at the Seattle Veterans Administration Medical Center and a review of the literature. *Rev. Infect Dis*. 1980; 2:746-760.
204. **Liu JH, Wei SH, Ma JY, Zeng ZL, Lü DH, Yang GX, Chen ZL.** Detection and characterisatio of CTX-M and CMY-2  $\beta$ -lactamases among *Escherichia coli* isolates from farm animals in Guangdong province of China. *Int J Ant Agents*. 2007; 29:576-581.
205. **Liu J-H, Wei S-Y, Ma J-Y, Zeng Z-L, Lu D-H, Yang G-X.** Detection and characterization of CTX-M and CMY-2  $\beta$ -lactamases among *Escherichia coli* isolates from farm animals in Guangdong province of China. *Intern J Antimicrob Agents*. 2007; 29:576-581.
206. **Livermore DM, Cantón R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G.** CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59:165-174.

207. **Livermore DM.**  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995; 8:557-584.
208. **Livermore, DM, Canton, R., Gniadkowski, M. Nordmann, P., Rossolini, GM, Arlet, G., Ayala, J., Coque, TM, Kern-Zdanowicz, I.** CTX-M: cambiar la faz de las BLEE en Europa. *J Antimicrob Chemother* . 2007; 59: 165 -174.
209. **Lowe CF, Katz K, McGeer AJ, Muller MP.** Toronto ESBL Working Group. Efficacy of admission screening for extended-spectrum Beta-lactamase producing *enterobacteriaceae*. *PLoS One*. 2013; 8:62678.
210. **Luzzaro F, Viganò EF, Fossati D, Grossi A, Sala A, Sturla C.** Prevalence and drug susceptibility of pathogens causing bloodstream infections in northern Italy: a two-year study in 16 hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002; 21:849.
211. **Mackowiak PA, Martin RM, Jones SR.** Pharyngeal colonization by gram negative bacilli in aspiration prone persons *Arch Intern Med*. 1978; 338:1224-1227.
212. **Manges AR, Johnson JR, Foxman B, O'Bryan TT, Fullerton KE, Riley LW.** Distribución generalizada de infecciones del tracto urinario causadas por una multirresistente *Escherichia coli* grupo clonal. *N Engl J Med*. 2001; 345: 1007-1013.
213. **Mantilla JR, Valenzuela EM, Gil CA, Leal AL.** Caracterización molecular de *Klebsiella pneumoniae* productora de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido ( $\beta$ LEE) del tipo CTM-X-12. *Infectio*. 2004; 8: 143.
214. **Margall N, Domínguez A, Prats G, Salleras L.** *Escherichia coli* Enterohemorrágico *Revista Española de Salud Pública*. 1997; 71: 437-443.
215. **Marin M. & Gudiol F.** *Enferm Infect Microbiol Clin*. 2003; 21: 42-55.
216. **Maurelli AT, Ferandez RE, Bloch CA.** Black holes and bacterial pathogenicity; a large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:3943-3948.
217. **Mavroidi A, Tzelepi E, Miriagou V, Gianneli D, Legakis NJ y Tzouveleki LS.**  $\beta$ -lactamasas 3 CTX-M- *Escherichia coli* procedentes de Grecia. *Microb Drogas Resistencia*. 2002; 8:35-37.

218. **McPeake SJW, Smyth JA, & Ball HJ.** Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. *Vet Microbiol.* 2005; 110:245-253.
219. **Mederios AA.,** Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Clin Infect Dis.* 1997; 24:19-45.
220. **Mella, S.** Propiedades microbiológicas, clasificación y relación estructura actividad de cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de cuarta generación. *Rev Chil Infect.* 2001; 18: 7-17.
221. **Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtiss R, Lehoux B, and Fairbrother JM.** Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infection and Immunity.* 2003b; 494-503.
222. **Melzer M, Petersen I.** Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. *J Infect.* 2007; 55:254-259.
223. **Menon T, Bindu D, Kumar CP, Nalini S, Thirunarayan MA.** Comparison of double disc and three dimensional methods to screen for ESBL producers in a tertiary care hospital. *Indian J Med Microbiol.* 2006; 24:117-120.
224. **Mensa J, Gatell JM, Jiménez de Anta MT, Prats G, Domínguez-Gil A.** *Pantoea agglomerans*. En Guía de terapéutica antimicrobiana. *Editorial Masson. Barcelona.* 2004; 236.
225. **Mesa RJ, Blanc V, Blanch A, Cortés P, González JJ, Lavilla S.** Extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58:211-215.
226. **Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P.** *Pseudomonas aeruginosa* Resistance and therapeutic options at the turn of the new millenium. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13:560-578.
227. **Meunier D, Jouy E, Lazizzera C, Kobisch M, Madec JY.** CTX-M-1 and CTXM-15-type  $\beta$ -Lactamases in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from food-producing animals in France. *J Antimicrob Agents.* 2006; 28:402-407.

228. **Miquel Pujol y Carmen Peña.** El significado clínico de las betalactamasas de espectro extendido (editorial) *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003; 21(2):69-71.
229. **Miranda G, Kelly C, Solorzano F, Leanos B, Coria, Patterson JE.** Use of pulsed-field gel electrophoresis typing to study an outbreak of infection due to *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* .1996; 34: 3138-3141.
230. **Mirelis B, Navarro F, Miró E, Mesa RJ, Coll P, Prats G.** Community transmission of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9:1024-1025.
231. **Monroy MA, Knöbl T, Bottino JA, Astolfi CS, and Ferreira A J.** Virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates obtained from broiler breeders with salpingitis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* 2005; 28: 1-15.
232. **Moreno MA., Teshager T., Porrero MC., Garcia M., Escudero E., Torres C. y Dominguez L.** Abundance and phenotypic diversity of *Escherichia coli* isolates with diminished susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins in faeces from healthy food animals after slaughter. *Vet Microbiol.* 2007; 120:363-369.
233. **Nataro JP, Kaper JB, RobinS-Browne R, et al.** Patterns of adherence of Diarrheagenic *E. coli* to HEp-2 cells. *Pediatr. Infect Dis* 1987; 76: 829-831.
234. **Nataro JP, Kaper JB.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 1998; 11: 142-201.
235. **Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B.** Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 29:524–534.
236. **Neidhardt FC.** *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular Biology. 2<sup>nd</sup> edition. *ASM Press, Washington* 1999.
237. **Ochman H & Selander RK.** Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J. Bacteriol.* 1984; 157:690-692.
238. **Olesen B., Kolmos HJ., Orskov F., Orskov yo.** Cluster de multirresistentes *Escherichia coli* O78: H10 con mayor Copenhagen. *Scand J Infect Dis.* 1994; 26: 406-410.

239. **Oliver A, Cantón R.** Enterobacterias productoras de  $\beta$ -Lactamasas plasmídicas de espectro extendido. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 2003.
240. **Oliver DB.** Periplasm. In Neidhardt FC, editor. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular Biology*, Washington, DC; ASB Press 1996; 58-87.
241. **Ørskov F, Ørskov I.** *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol.* 1992; 38:674-699.
242. **Osborn M, Bron S, Firth N, Holsappel S, Huddleston A, Kiewiet R, Meijer W, Segers J, Skurray R, Terpstra P, Thomas CM, Thorsted P, Tietze E, Turner SL.** The Evolution of bacterial plasmids. In: The Horizontal Gene Pool: Bacterial plasmids and gene spread. C. M. Thomas (ed). Hardwood Academic Publishers. Amsterdam, 2000; 301-361.
243. **Osborn AM, D. Boltner D.** When phage, plasmids, and transposons collide: genomic islands, and conjugative- and mobilizable-transposons as a mosaic continuum. *Plasmid.* 2002; 48:202-212.
244. **Oswald, E., Mainil, J., Blanco, M., and Blanco, J.** Common Virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *J Clin Microbiol.* 2006; 3484-3492.
245. **Oteo J, Pérez-Vázquez M, Campos J.** Extended-spectrum [beta]-lactamase producing *Escherichia coli*: changing epidemiology and clinical impact. *Curr Opin Infect Dis.* 2010; 23:320-6.
246. **Pallett A, Mano K.** Infecciones complicadas del tracto urinario: soluciones prácticas para el tratamiento de multirresistentes bacterias gram-negativas. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 25-33.
247. **Palucha A, Mikiewicz B, Hryniewicz W, y Gniadkowski M.** Brotes simultáneos de espectro extendido organismos  $\beta$ -lactamasas de la familia Enterobacteriaceae en un hospital de Varsovia. *J. Antimicrob.Chemother.* 1999; 44: 489-499.
248. **Park JT.** The murein sacculus. In: Neidhardt PC. Editor. *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology.* Washington DC; ASM Press 1996; 48-57.

249. **Park YS, Adams-Haduch JM, Rivera JI, Curry SR, Harrison LH, Doi Y.** *Escherichia coli* producing CMY-2  $\beta$ -lactamase in retail chicken, Pittsburgh, Pennsylvania, USA. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18:515-16.
250. **Paterson D, Hujer K, Hujer A, Yeiser B, Bonomo M, Rice L.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: Dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 3554-3560
251. **Paterson DL, Bonomo RA.** Extended-spectrum beta-lactamases: A clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18:657–686.
252. **Peirano G, Costello M, Pitout JD.** Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from the Chicago area: high prevalence of ST131 producing CTX-M-15 in community hospitals. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 36:19-23.
253. **Peralta G, Sánchez MB, Garrido JC, De Benito I, Cano ME, Martínez-Martínez L.** Impact of antibiotic resistance and adequate empirical antibiotic treatment in the prognosis of patients with *Escherichia coli* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60: 855-863.
254. **Philippon, A, Labia R, Jacoby G.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33: 1131–1136.
255. **Phillips I, Eykyn S, Rey A, Gransden WR, Rowe B, Frost JA.** Epidemia multirresistente *Escherichia coli* infección en el oeste de Lambeth de Salud del Distrito. *Lancet.* 1988; 331:1038-1041.
256. **Pitout JD, Gregson DB, Iglesia DL, Elsayed S, Laupland KB.** Brotes comunitarios de clonalmente relacionados con CTX-M-14 beta-lactamasa que producen *Escherichia coli* cepas en la región sanitaria de Calgary. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 2844-2849.
257. **Pitout JD, Laupland KB.** Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* 2008; 8:159-166.

258. **Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L.** Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56:52-59.
259. **Pitout JD.** Infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing *enterobacteriaceae*: changing epidemiology and drug treatment choices. *Drugs.* 2010; 70:313-33.
260. **Pitout JDD, Laupland KB.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Enterobacteriaceae*: An emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* 2008; 8:159-166.
261. **Podschun R, Ullmann U.** *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11:589-603.
262. **Poirel L, Heritier C.** Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 15-22.
263. **Poirel L, Guibert M, Girlich D.** Cloning, sequence analyses, expression, and distribution of *ampC-ampR* from *Morganella morganii* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43:769-776.
264. **Poirel L, Kampf P, Nordmann P.** Chromosome-encoded Ambler class A beta lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:3038-3039.
265. **Prats G, Mirelis B, Miró E, Navarro F, Llovet T, Johnson JR.** Cephalosporin-resistant *Escherichia coli* among summer camp attendees with salmonellosis. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9:1273-1280.
266. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *SEIMC* 2011.
267. **Pupo GM, Karaolis DKG, Lan RT.** Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. *Infect Immun.* 1997; 65:2685-2692.

268. **Qadri, F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB.** Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol.* 2005; 18:465-483.
269. **Quinteros M, Radice M, Gardella N, Rodríguez MM, Costa N, Korbenfeld D.** Extended-spectrum beta-lactamases in enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2864-2867.
270. **Racicot C, Prussing C, Boerlin P, Daignault D, Dutil L.** Chicken as Reservoir for Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in Humans, Canada. *Emerging Infectious Diseases.* 2012; 18: 415-421
271. **Raetz CRH.** Bacterial lipopolysaccharides a remarkable family of bioactive macroamphiphiles. In: Neidhardt FC, editor. *Escherichia coli* and *Salmonella. Cellular and Molecular Biology.* Washington, DC: ASM Press. 1996; 1035-1063.
272. **Rahn K, Renwick SA, Johnson PR, Wilson JB, Clarke RC, Alves D, McEwen SA, Lior H.** Estudio de seguimiento de la infección por *Escherichia coli* verocytotoxigenic en lácteos familias campesinas. *Journal of Infectious Disease.* 1998;177:1139-1139
273. **Ramchandani M, Manges AR, DebRoy C, Smith SP, Johnson JR, Riley LW.** Possible animal origin of human-associated, multidrug-resistant, uropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis.* 2005; 40:251-257.
274. **Randall LP, Clouting C, Horton RA, Coldham NG, Wu G, Clifton-Hadley FA, Davies RH, Teale CJ.** Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66:86-95.
275. **Raz R, Stamm WE.** A Controlled trial of intravaginal estriol in postmenopausea women with recurrent urinary tract infections. *N Engl J Med.* 1993; 329:753-756.
276. **Recchia GD, Hall RM.** Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol.* 1997; 5:389-394.

277. **Reife RA, Shapiro RA, Bamber BA, Berry K, Mick GE, and Darveau RP.** Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide Is Poorly Recognized by Molecular Components of Innate Host Defense in a Mouse Model of Early Inflammation. *Infect Immun.* 1995;4686-4694.
278. **Riaño I, Moreno MA, Teshager T, Sáenz Y, Domínguez L, Torres C.** Detection and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Salmonella* enterica strains of healthy food animals in Spain. *Antimicrob Chemother.* 2006; 58:844-847.
279. **Rice W, Chippindale A.** Sexual recombination and the power of natural selection. *Science.* 2001; 294:555-559.
280. Rodríguez.-Baño J, Navarro MD. Extended-spectrum beta-lactamases in ambulatory care: a clinical perspective. *Clin Microbiol Infect.* 2008;1:104-110.
281. **Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL.** Escherichia coli O25b-ST131: una pandemia, la cepa multirresistente, la comunidad asociada. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011; 66, 1-14.
282. **Romero L, López L, Rodríguez-Baño J, Ramón Hernández J, Martínez Martínez L, Pascual A.** Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11:625-631.
283. **Rothbaum R, McAdams AJ, Giannella R, Partin JC.** A clinic pathologic study of enterocyte-adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrhea in infants. *Gastroenterology.* 1982; 83:441.
284. **Rubio C, Gil J, Gómez-Lus R.** Significado clínico de las resistencias bacterianas. En (Gómez J, Gobernado M. Eds). Enfoque clínico de los Grandes Síndromes Infecciosos. *Madrid Ergón Ed. 2ªed.* 2006; 27-36.
285. **Russo TA, Moffitt MC, Hammer CH, and Frank MM.** Tnpho A mediated disruption of K54 capsular polysaccharide genes in *Escherichia coli* confers serum sensitivity. *Infect Immun.* 1993; 61:3578-3582.

286. **Russo TA, Liang Y, cross AS.** The presence of K54 capsular polysaccharide increases the pathogenicity of *Escherichia coli* in vivo. *J Infect Dis.* 1994; 169:112-118.
287. **Russo TA, Johnson JR.** Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli* ExPEC. *J Infect Dis.* 2000; 18:1753-1754.
288. **Russo TA, Johnson JR.** Impacto médico y económico de las infecciones extraintestinales por *Escherichia coli*: se centran en un problema endémico cada vez más importante. *Microbios Infect.* 2003; 5: 449-456.
289. **Sabaté M, Miró E, Navarro F, Vergés C, Aliaga R, Mirelis B, Prats G.** Novel complex sul 1 thype integron in *Escherichia coli* carrying *bla*<sub>CTX-M-9</sub>. *Ant Agents Chemother.* 2002; 46:2656-2661.
290. **Saenz Y, Zarazaga M, Brinas L, Lantero M, Ruiz-Larrea F, Torres C.** Resistencia a antibióticos en *Escherichia coli* aislados obtenidos de animales, alimentos y seres humanos en España *Int. J Antimicrob Agentes.* 2001; 18:353-358.
291. **Saladino M, Cao VT, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ould-Hocine Z, Verdet C, Delisle F, Philippon A, y Arlet G.** Diversidad de CTX-M beta-lactamasas y sus regiones promotoras de enterobacterias aisladas en tres hospitales parisinos. *FEMS Microbiol.* 2002; 209: 161-168.
292. **Salam MA, Bennish ML.** Antimicrobial therapy for shigellosis. *Rev Infect Dis.* 1991; 13:332-341.
293. **Sánchez B.** Betalactamasas de espectro extendido. *Rev Electr de Med Intensiva.* Disponible en: <http://remi.uninet.edu/2004/08/REMIC06.htm>.
294. **Sander WE Jr, Sanders CC.** *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10:220-241.
295. **Scheutz F, Moller Nielsen E, Frimodt-Moller J, Boisen N, Morabito S, Tozzoli R.** Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. *Euro Surveill.* 2011; 16:19889.

296. **Schreiber JR., Jacobs MR.** Antibiotic-resistant pneumococci. *Pediatr Clin North Am.* 1995; 42:519-537.
297. **Schroeder CM, Blanco DG, Ge B, Zhang Y, McDermott PF, Ayers S.** Aislamiento de los resistentes a los antimicrobianos de *Escherichia coli* por menor de carnes compradas en mayor Washington, DC, EE.UU. *Int J Food Microbiol.* 2003; 85: 197 - 202.
298. Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or AmpC  $\beta$ -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA Journal.* 2011; 9:2322.
299. **Sheikh AA, Checkley S, Avery B, Chalmers G, Bohaychuk V, Boerlin P, Reid-Smith R, Aslam M.** Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* isolated from retail meat purchased in Alberta, Canada. *Foodborne Pathog Dis.* 2012; 9:625-31.
300. **Shiraki Y, Shibata N, Doi Y, Arakawa Y.** *Escherichia coli* producing CTX-M-2  $\beta$ -lactamase in Cattle, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10:69-75.
301. **Siek K, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Fakhr MK, Nolan L.K.** Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology.* 2005b; 151: 2097-2110.
302. **Sivapalasingam S, Nelson JM, Joyce K, Hoekstra M, Angulo FJ, Mintz ED.** High prevalence of antimicrobial resistance among *Shigella* isolates in the United States tested by the National Antimicrobial Resistance Monitoring System from 1999 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:49-54.
303. **Skyberg JA, Johnson TJ, Johnson, JR, Clabots C, Logue CM, Nolan LK.** Acquisition of Avian Pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. *Infection and Immunity.* 2006; 74: 6287-6292.
304. **Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Catry B.** Diversity of extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases among cloacal *Escherichia coli* Isolates in Belgian broiler farms. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:1238-1243.

305. **Smith JL, Fratamico PM and Gunther NW.** Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog. Dis* 2007; 4:134-163.
306. **Sørum H, Sunde M.** Resistencia a los antibióticos en la flora normal de los animales. *Vet. Res.* 2001; 32: 227-241.
307. **Spratt BG.** Penicillin-binding proteins and the future of betalactam antibiotics. *J. Gen Microbiol.* 1963; 129:1247-1246.
308. **Struve C, Krogfelt KA.** Role of casule in *Klebsiella pneumoniae* virulence lack of correlation between in vitro and in vivo studies. *FEMS Microbiol Lett.* 2003; 218: 149-154.
309. **Tafur JD, Torres JA, Villegas MV.** Mecanismos de Resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infection.* 2008; 12: 223-233.
310. **Tang LM, Chen ST.** *Klebsiella ozaenae* meningitis: report of two cases and review of the literature. *Infection.* 1994; 22:58-61.
311. **Tao M, Coque TM, Ruiz-Garbajosa P.** Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of *Enterobacteriaceae* infection involving VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in Spain. Toward endemicity. *Clin Infect Dis.* 2007; 45:1171-1178.
312. **Tassios PT, Gazouli M, Tzelepi E, Milch H, Kozlova N, Sidorenko S, Legakis NJ y Tzouvelekis LS.** Diseminación de la *Salmonella typhimurium* resistentes a las cefalosporinas clon ampliado espectro en tres países europeos. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 3774-3777.
313. **Taylor DE, Gribeel A, Lawley TD, Tracz DM.** Antibiotic resistance plasmids. In: *Plasmid Biology.* Funnell BE, Phillips GJ (eds). American Society for Microbiology, Washington D.C. 2004.
314. **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2233-2239.
315. **Teshager T, Domínguez L, Moreno MA, Sáenz Y, Zarazaga M, Torres C.** Isolation of an SHV-12 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strain from a dog with

- recurrent urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:3483-3484.
316. **Thomas CM.** Evolution and population genetics of bacterial plasmids. In: *Plasmid Biology.* Funnell BE, Phillips GJ (eds). American Society for Microbiology, Washington D.C. 2004.
317. **Thomson KS, Sanders CC.** Detection of extended spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36:1877-82.
318. **Thomson JM, Bonomo RA.** The treat of antibiotic resistance in gram-negative pathogenic bacteria Beta-lactamasa in perill. *Curr Opin Microbiol.* 2005; 8:518-524.
319. **Tipper DJ y Strominger JL.** Mechanism of action of peniciline: A proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1965; 54:1133-1141.
320. **Todar K.** Pathogenic *E. coli.* University of Winconsin-Madison, en <http://www.textbookofbacteriology.net/> Department of Bacteriology, 2008.
321. **Torres C, Zarazaga M.** BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007;2:29-37
322. **Toussaint A, Merlin C.** Mobile elements as a combination of functional modules. *Plasmid.* 2002; 47:26-35.
323. **Trevena WB, Willshaw GA, Cheasty T, Domingue G.** La transmisión de la producción de citotoxina Vero *Escherichia coli* O157 infección de los animales de granja a los humanos en Cornualles y oeste de Devon. *Enfermedades en la comunidad y la salud pública.* 1999; 2: 263-268.
324. **Tsay RW, Siu LK, Fung CP, Chang FY.** Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infection: risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection. *Arch Intern Med.* 2002; 162:1021-1027.

325. **Tumbarello M, Spanu T, Sanguinetti M.** Bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* risk factors, molecular epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:498-504.
326. **Turner SM, Scott-Tucker A, Cooper LM, and Henderson IR.** Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol.* 2006; 263:10-20.
327. **Valenzuela de Silva EM, Mantilla JR, Reguero MT, González EB, Pulido IY, Llerena ID.** Detection of CTX-M-1, CTX-M-15, and CTXM- 2 in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Bogotá, Colombia. *J Clin Microbiol.* 2005; 44: 1919-1920.
328. **Valverde A, Coque TM, Sánchez-Moreno MP, Rollán A, Baquero F, Cantón R.** Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. *J Clin Microb.* 2004; 42:4769-4775.
329. **Vandekerchove D, Herdt PD, Laevens, H, Butaye P, Meulemans G, and Pasmans F.** Significance of interactions between *Escherichia coli* and respiratory pathogens in layer hen flocks suffering from colibacillosis-associated mortality. *Avian Pathology.* 2004a; 33: 298-302.
330. **Vandekerchove D, De Herdt P, Laevens H, Pasmans F.** Colibacillosis in caged layer hens: characteristics of the disease and the aetiological agent. *Avian Pathology.* 2004c; 33: 117-125.
331. **Vieira AR, Collignon P, Aarestrup FM, McEwen SA, Hendriksen RS, Hald T, Wegener HC.** Asociaciones entre la resistencia a los antimicrobianos en *Escherichia coli* aisladas de animales destinados al consumo y los aislados flujos de sangre de los seres humanos en Europa: un estudio ecológico. *Foodborne Pathog Dis.* 2011; 8:1295-1301.
332. **Vincent C, Boerlin P, Daignault D, Dozois CM, Dutil L, Galanakis C.** Alimentos depósito para *Escherichia coli* causantes de infecciones del tracto urinario. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16: 88-95.

333. **Wang HH, Manuzon M, Lehman, Wan K, Luo H, Wittum TE.** Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol.* 2006; 254:226-231.
334. **Warren RE, Ensor VM, O'Neill P, Butler V, Taylor J, Nye K.** Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:504-508.
335. **Weiss RA.** . Animal origins of human infectious diseases. *Phil Trans R Soc Lond B* 2001; 356:957-977.
336. **Weldhagen GF.** Integrons and beta-lactamases. A novel perspective on resistance. *Int J Antimicrob Agents* .2004; 23:556-562.
337. **Winfield MD, Groisman EA.** Role of nonhost environments in the lifestyles of Salmonella and Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69:3687-3694.
338. **Yi ZM, Yang H, Xiang XD.** Characteristics of bacteriology and drug sensitivity in patients with COPD combined with pneumonia. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2003; 28:272.
339. **Yu, WL, Chuang, YC y Walther-Rasmussen, J.** espectro extendido beta-lactamasas de Taiwán.: epidemiología, detección, tratamiento y control de infecciones. *J Microbiol Immunol Infect.* 2006; 39: 264 -277.
340. **Yuan M, Aucken H.** Epidemiological typing of *klebsiellae* with extended-spectrum beta-lactamases from European intensive care units. *J Antimicrob Chemother.* 1998; 41: 527-39.
341. **Yuan L, Liu JH, Hu GZ, Pan YS, Liu ZM, Mo J, Wei YJ.** Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from chickens in Henan Province, China. *J Med Microbiol.* 2009; 58:1449-1453.
342. **Zapun A, Contreras Martel C, Vernet T.** Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2008; 32:361-385.
343. **Zgurskaya HI, Nikaido H.** Multidrug resistance mechanisms: Drug efflux across two membranes. *Mol Microbiol.* 2000; 37:219-225.

344. **Zhang L, Foxman B.** Epidemiología molecular de *Escherichia coli* mediada infecciones del tracto urinario. *Front Biosci.* 2003; 8:235-244.
345. **Zhao S, Blickenstaff K, Bodeis-Jones S, Gaines SA, Tong E, McDermott PF.** Comparison of the Prevalences and Antimicrobial Resistances of *Escherichia coli* Isolates from Different Retail Meats in the United States, 2002 to 2008. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78:1701-1707.