Resistència antimicrobiana en patògens bacterians causants de diarrea: recerca d'alternatives

Maria Jesús Pons Casellas

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (**www.tdx.cat**) i a través del Dipòsit Digital de la UB (**diposit.ub.edu**) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (**www.tdx.cat**) y a través del Repositorio Digital de la UB (**diposit.ub.edu**) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (**www.tdx.cat**) service and by the UB Digital Repository (**diposit.ub.edu**) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

RESISTÈNCIA ANTIMICROBIANA EN PATÒGENS BACTERIANS CAUSANTS DE DIARREA: RECERCA D'ALTERNATIVES

Memòria presentada per **Maria Jesús Pons Casellas** per aspirar al títol de Doctora per la Universitat de Barcelona

Director de tesi: Dr. **Joaquim Ruiz Blázquez**

Programa de Doctorat en Medicina

Línia d'investigació: Salut Internacional

Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona (CRESIB)

Hospital Clínic

Universitat de Barcelona

2014

El **Dr. Joaquim Ruiz Blázquez**, investigador del Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona (CRESIB), certifica que la tesi titulada "**Resistència antimicrobiana en patògens bacterians causants de diarrea: recerca d'alternatives**" presentada per **Maria Jesús Pons Casellas** ha estat realitzada sota la seva direcció, i compleix tots els requisits que dicta la normativa vigent per a la presentació de tesis doctorals com a compendi d'articles a la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

Dr. Joaquim Ruiz

Barcelona, gener del 2014

ARTICLES QUE CONSTITUEIXEN AQUESTA TESI DOCTORAL

1

"Molecular mechanisms of antibiotic resistance in diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolated from children"

Susan Mosquito, Joaquim Ruiz, Maria J. Pons, David Durand, Francesca Barletta, Theresa J. Ochoa

International Journal Antimicrobial Agents. 2012 Dec;40(6):544-8.

Factor d'impacte: 4,415

Quartil: 1 (Infectious diseases)

2

"Levels of quinolones resistance and other antimicrobial in non-pathogenic Escherichia coli strains in children from the periurban area of Lima, Peru"

Maria J. Pons, Susan Mosquito, Theresa J. Ochoa, Martha Vargas, Margarita Molina, Angela Lluque, Ana I. Gil, Lucie Ecker, Francesca Barletta, Claudio F. Lanata, Luis Javier Del Valle, Joaquim Ruiz.

Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. 2012 Mar;29(1):82-6.

Factor d'impacte: -

3

"Analysis of quinolone-resistance in comensal and diarrheagenic *Escherichia coli* isolates from infants in Lima, Peru"

Maria J. Pons, Susan Mosquito, Claudia Gomes, Luis J. del Valle, Theresa J. Ochoa, Joaquim Ruiz.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.2014. 108 (1): 22-28

doi:10.1093/trstmh/trt10

Factor d'impacte: 1,82

Quartil: 1 (Tropical Medicine)

4

"Antimicrobial resistance in *Shigella* spp. causing traveller's diarrhoea (1995-2010): A retrospective analysis"

Maria J. Pons, Claudia Gomes, Sandra Martínez-Puchol, Lídia Ruiz, Laura Mensa, Jordi Vila, Joaquim Gascón, Joaquim Ruiz.

Travel Medicine and Infectious Diseases. 2013 Jul 23. doi:pii: S1477-8939(13)00103-8. 10.1016/j.tmaid.2013.06.010.

Factor d'impacte: 1,77

Quartil: 2 (Public, environmental & occupational health)

5

"*In vitro* antimicrobial activity of rifaximin against enteropathogens causing traveler's diarrhea"

Joaquim Ruiz, Laura Mensa, Cristina O'Callaghan, Maria J. Pons, Ana González, Jordi Vila, Joaquim Gascón.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2007 Dec;59(4):473-5.

Factor d'impacte: 2,448

Quartil: 2 (Microbiology)

6

"Development of *Escherichia coli* rifaximin-resistant mutants: frequency of selection and stability"

Joaquim Ruiz, Laura Mensa, Maria J. Pons, Jordi Vila, Joaquim Gascón.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2008 May; 61(5):1016-9.

Factor d'impacte: 4,328

Quartil: 1 (Microbiology)

7

"Fitness and molecular mechanisms of resistance to rifaximin in *in vitro* selected *Escherichia coli* mutants"

Maria J. Pons, Laura Mensa, Joaquim Gascón, Joaquim Ruiz.

Microb Drug Resist. 2012 Aug;18(4):376-9.

Factor d'impacte: 2,364

Quartil: 2 (Pharmacology & pharmacy)

8

"Relevant role of efflux pumps in high levels of rifaximin resistance in *Escherichia coli* clinical isolates"

Claudia Gomes, Lidia Ruiz, Maria J. Pons, Theresa J. Ochoa, Joaquim Ruiz

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2013 Sep;107(9):545-9

Factor d'impacte: 1,82

Quartil: 1 (Tropical Medicine)

A la mama,

a tu,

al món

RESISTÈNCIA ANTIMICROBIANA en patògens bacterians causants de DIARREA: recerca d'alternatives

Índex

INTRODUCCIÓ

1. La diarrea- - - - - - - - - -1

1.1 Introducció i importància- - - - - -1

1.2 Etiologia- - - - - - - - -3

1.2.1 *Escherichia coli* diarreogèniques- - - -4

- *E. coli* enteroagregativa, EAEC- - - -6

- *E. coli* enterotoxigènica, ETEC- - - -7

- *E. coli* enteropatogènica, EPEC- - - -7

- *E. coli* enteroinvasiva, EIEC- - - - -8

- *E. coli* enterohemorràgica, EHEC- - - -8

- *E. coli* difusament adherent, DAEC-- - -9

1.2.2 *Shigella* spp. - - - - - - -9

1.3 Prevenció i tractament- - - - - -10

Comentari: “Prevention of travellers’diarrhoea: where and who?” -14

2. Resistència antimicrobiana- - - - - - - -15

2.1 Importància- - - - - - - - -15

2.2 Disseminació de la resistència: els elements genètics mòbils- - -19

- Plasmidis- - - - - - - -20

- Transposons- - - - - - -21

- Integrons- - - - - - - -21

2.3 Descripció de les principals famílies i les seves resistències- - -23

- Les tetraciclines- - - - - -23

- Els aminoglicòsids- - - - - - -25

- Els fenols (Cloramfenicol)- - - - - -25

- Els β-lactàmics- - - - - - -25

- Els macròlids- - - - - - -26

- Les sulfonamides- - - - - - -27

- Les quinolones- - - - - - -28

- mutacions als enzims diana-- - - - -30

- disminució de l'acumulació d'antibiòtic- - -31

- mecanismes transferibles- - - - -31

- Qnr- - - - - - -31

Carta: "*QnrVC* , a new transferable q*nr*-like family"-37

- AAC(6') Ib-cr- - - - -34

- QepA- - - - - -35

- OqxAB- - - - - -35

Revisió: "Transferable mechanisms of quinolone resistance"- - - - - - -37

- La rifaximina- - - - - - -46

2.3 Rol de les bombes d'expulsió- - - - - - -49

2.4 Resistència a antimicrobians i ambient- - - - -53

2.6 Resistència a antimicrobians en microbiota- - - -54

2.7 Resistència a antimicrobians a països de mitja-baixa renda - -55

2.8 Resistència a antimicrobians a Amèrica Llatina-- - - -57

HIPÒTESIS I OBJECTIUS- - - - - - - - -59

METODOLOGIA- - - - - - - - -63

RESULTATS- - - - - - - - - -67

ARTICLE 1: "Molecular mechanisms of antibiotic resistance in diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolated from children"

ARTICLE 2: "Levels of quinolones resistance and other antimicrobial in non-pathogenic *Escherichia coli* strains in children from the periurban area of Lima, Peru"

ARTICLE 3: "Analysis of quinolone-resistance in comensal and diarrheagenic *Escherichia coli* isolates from infants in Lima, Peru"

ARTICLE 4: "Antimicrobial resistance in *Shigella* spp. causing traveller's diarrhoea (1995-2010): A retrospective analysis"

ARTICLE 5: "*In vitro* antimicrobial activity of rifaximin against enteropathogens causing traveler's diarrhea"

ARTICLE 6: "Development of *Escherichia coli* rifaximin-resistant mutants: frequency of selection and stability"

ARTICLE 7: "Fitness and molecular mechanisms of resistance to rifaximin in *in vitro* selected Escherichia coli mutants"

ARTICLE 8: "Relevant role of efflux pumps in high levels of rifaximin resistance in *Escherichia coli* clinical isolates"

DISCUSSIÓ- - - - - - - - - -133

CONCLUSIONS (Català)/ CONCLUSIONS (English)- - - - - -145

REFERÈNCIES- - - - - - - - - -153

ANNEX- - - - - - - - - -163

AGRAÏMENTS- - - - - - - - -165

LA DIARREA

Introducció i importància

La diarrea és la segona causa de mort en nens menors de 5 anys a nivell mundial, essent responsable de la mort de 2 milions de nens l'any, només superat per la pneumònia. [1] És important destacar que aquesta patologia mata més infants que la SIDA, la malària i la rubèola junts. [2] Cal dir que la majoria d'aquests casos succeeixen en països de baixa renda, degut a les seves condicions higienico-sanitàries i de diagnòstic deficients, [1, 2] és en aquests països on la incidència de diarrea varia entre 3 i 10 episodis l'any, mentre que en els països industrialitzats la incidència és de menys d'1 episodi a l'any. [3] (Figura 1)

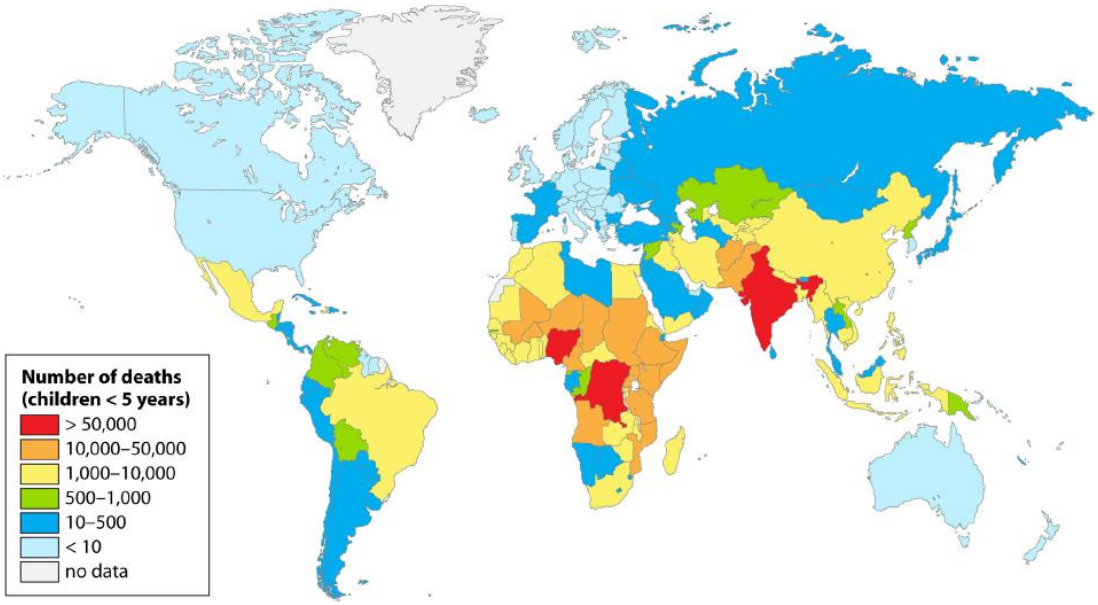


Figura 1: Mortalitat a nivell mundial associada a diarrea en nens menors de 5 anys al 2010. (Font: Croxen MA *et al*. 2013).[4]

Aquesta patologia també afecta a la major part dels viatgers dels països desenvolupats, és l'anomenada diarrea del viatger (DV), que afecta milions de turistes cada any i genera una càrrega econòmica important. [5] La DV ocorre en 15-50% de les persones que viatgen a zones d'alt risc de zones tropicals o semitropicals d'Amèrica Llatina, el Carib, el sud d'Àsia i Àfrica. (Figura 2) Aproximadament 100 milions de

persones de països desenvolupats viatgen cada any a una d'aquestes regions d'alt risc, el que resulta en un màxim de 40 milions de casos de DV cada any. [5] Per fer-nos una idea, cada dia 40.000 persones que viatgen d'un país desenvolupat a un país de mitja-baixa renda pateixen diarrea aguda. [6] Essent aquesta patologia la principal causa de consulta mèdica post- viatge.

El factor més important de risc a l'hora de sofrir la DV és destí de viatge. Existeixen diferències regionals tant en el risc com en l'etiologia de la diarrea, i generalment el món es divideix en 3 graus de risc: baix, intermedi i alt. (Figura 2)

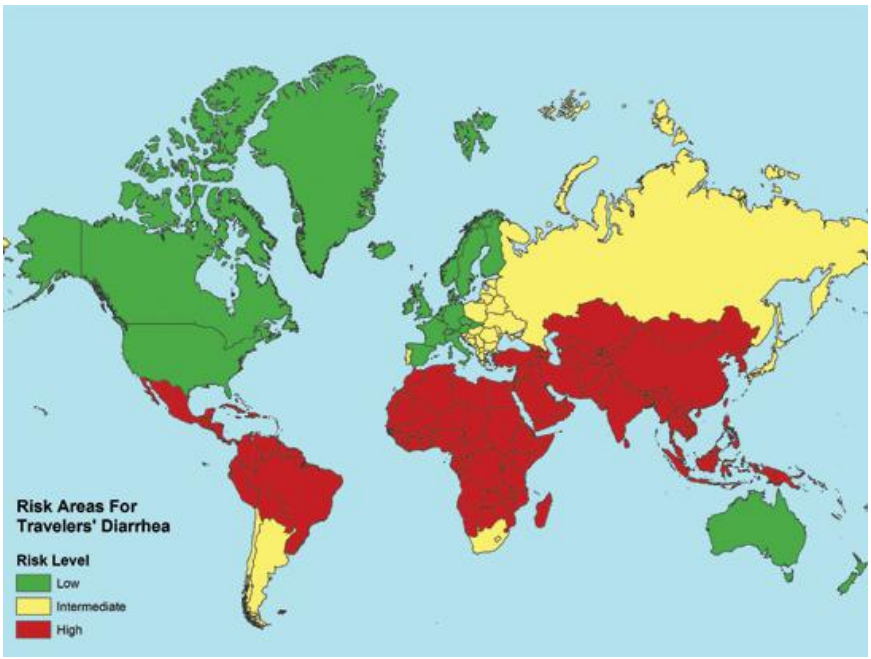


Figura 2: Mapa mundial d'àrees de risc de la diarrea del viatger. Vermell: zones d'alt risc, groc: zones de risc mitjà, verd: zones de baix risc. (wwwnc.cdc.gov)

Els països de baix risc inclouen als Estats Units, Canadà, Austràlia, Nova Zelanda i països d'Europa septentrional i occidental. Països de risc intermedi són els d'Europa de l'Est, Àfrica del Sud, Japó i algunes de les illes del Carib, i finalment trobem que la major part d'Àsia, l'Orient Mitjà, Àfrica, Mèxic, Amèrica Central i Amèrica del Sud són les àrees d'alt risc.

ETIOLOGIA DE LA DIARREA

Normalment la diarrea és símptoma d'una infecció al tracte intestinal que es dissemina a través de menjar, aigua per consum contaminada o contagi persona-persona com a resultat d'una higiene deficient. [7]

L'etiologia de la diarrea pot ser provocada per diferents agents causals: virus, bacteris i paràsits. Malgrat existir vacunes contra diferents genotipus de rotavirus, aquests son dels patògens aïllats més freqüentment com a causa de diarrea, i de mortalitat per diarrea, als nens de països de baixa i mitja renda. [8] Aquest fet es degut tant a la no introducció efectiva a aquestes àrees de les vacunes desenvolupades, com a la presència de genotips no inclosos a la cobertura de les mateixes. En conjunt, però, són els bacteris entèrics els que majorment s'associen a les diarrees infantils als països de mitja-baixa renda. [9] Per als viatgers els patògens bacterians són el principal risc, i representen entre un 80-90% de les causes de DV. Els virus intestinals es troben com a causants d'un 5-8% de les malalties. Per últim trobem els paràsits, que es caracteritzen per presentar una clínica més tardana i s'associen a un 10% de les consultes de DV. [10]

Entre els bacteris, el patogen més comú és *Escherichia coli*, seguit per *Campylobacter jejuni*, *Shigella* spp., i *Salmonella* spp. Tot i que ens els darrers anys, es cita a altres espècies bacterianes com *Aeromonas* spp. i *Plesiomonas* spp. com a agents potencials de diarrea. [11] En el món dels virus, els virus entèrics són els trobats amb major freqüència: rotavirus, seguit de norovirus i astrovirus. *Giardia* és el principal patogen protozoari que es troba relacionat amb la DV i diarrea infantil, també *Entamoeba histolytica* i *Cryptosporidium*, tot i que són patògens menys comuns en els viatgers. [8, 9] D'altra banda, també s'ha descrit *Cyclospora*, però lligat fortament a estacionalitat i determinades àrees geogràfiques, com per exemple: Nepal, Perú, Haití i Guatemala. *Dientamoeba fragilis* és un patogen lleu, però persistent, que en ocasions també s'ha associat a la diarrea en viatgers. [7, 10]

Escherichia coli

E. coli és un bacteri de forma bacil·lar, gramnegatiu, anaeròbic facultatiu i que es caracteritza, en la seva gran majoria, per fermentar la lactosa. Pertany a la família de les *Enterobacteriaeae*. Va ser descrit per primera vegada el 1885 per un bacteriòleg alemany i s'ha convertit en un dels microorganismes més estudiats de la història.

Aquest bacteri forma part de la flora comensal del humans i colonitza el tracte intestinal dels nadons al cap de poques hores de néixer. De forma habitual aporta beneficis al ser humà però, en determinades ocasions, segons les característiques de l'hoste, la patogenicitat i virulència del bacteri, pot arribar a causar infeccions greus.

Les soques patogèniques poden causar un ventall d'infeccions, les més comunes són les bacterièmies, les infeccions urinàries, i també la diarrea.

***E. colis* diarreogèniques**

Segons els factors de virulència que presenten les *E. coli* diarreogèniques s'han descrit 6 patotipus diferents: *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigènica (ETEC), *E. coli* enteropatogènica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorràgica (EHEC) i l'*E. coli* difusament adherent (DAEC). [12, 13] (Figura 3)

La característica més conservada de les soques d'*E. coli* diarreogèniques és la seva capacitat per colonitzar la superfície de la mucosa intestinal malgrat el peristaltisme propi de l'intestí i la competència pels nutrients amb la flora comensal (incloent altres soques d'*E. coli*). [13]

En ocasions especials, certes soques d'*E. coli* poden presentar característiques híbrides entre diferents patotips. Un exemple a destacar fou el brot de l'*E. coli* (STEC 0104-H4), on l'EAEC agafà la capacitat de produir la Shiga toxina, Stx2, típica de EHEC. [14]

Un tipus emergent d'*E. coli* patogènica, l'AIEC (*E. coli* adherent- invasiva), sembla estar associat a patologies com el Chron. Aquests bacteris es caracteritzen per no tenir uns factors de virulència específics, però s'associen a gens de virulència característics de les *E. coli* extraintestinals patogèniques (ExPEC), suggerint que el patotipus AIEC estaria

relacionat a ExPEC. [15]

Les *E. coli* diarreogèniques típiques representen probablement la causa més comuna de diarrea a nivell mundial. Així l'*E. coli* ha estat reconegut com la causa principal de gastroenteritis bacteriana, tant en països desenvolupats com en vies de desenvolupament. [9] Als països desenvolupats, *E. coli* es responsable de més del 50% de les diarrees del viatger. [7]

Concretament el tipus EPEC i ETEC s'han associat a mortalitat infantil en països en vies de desenvolupament. [9]

Segons el tipus d'*E. coli* que colonitzi, les manifestacions clíniques son diferents, essent això valid, tant per a diarrea infantil com per a la diarrea del viatger. Així, de manera general, una colitis hemorràgica i un síndrome urèmico- hemolític son causats per EHEC, una diarrea persistent per EAEC, i una diarrea aquosa en lactants sol ser causada per una EPEC. [9]

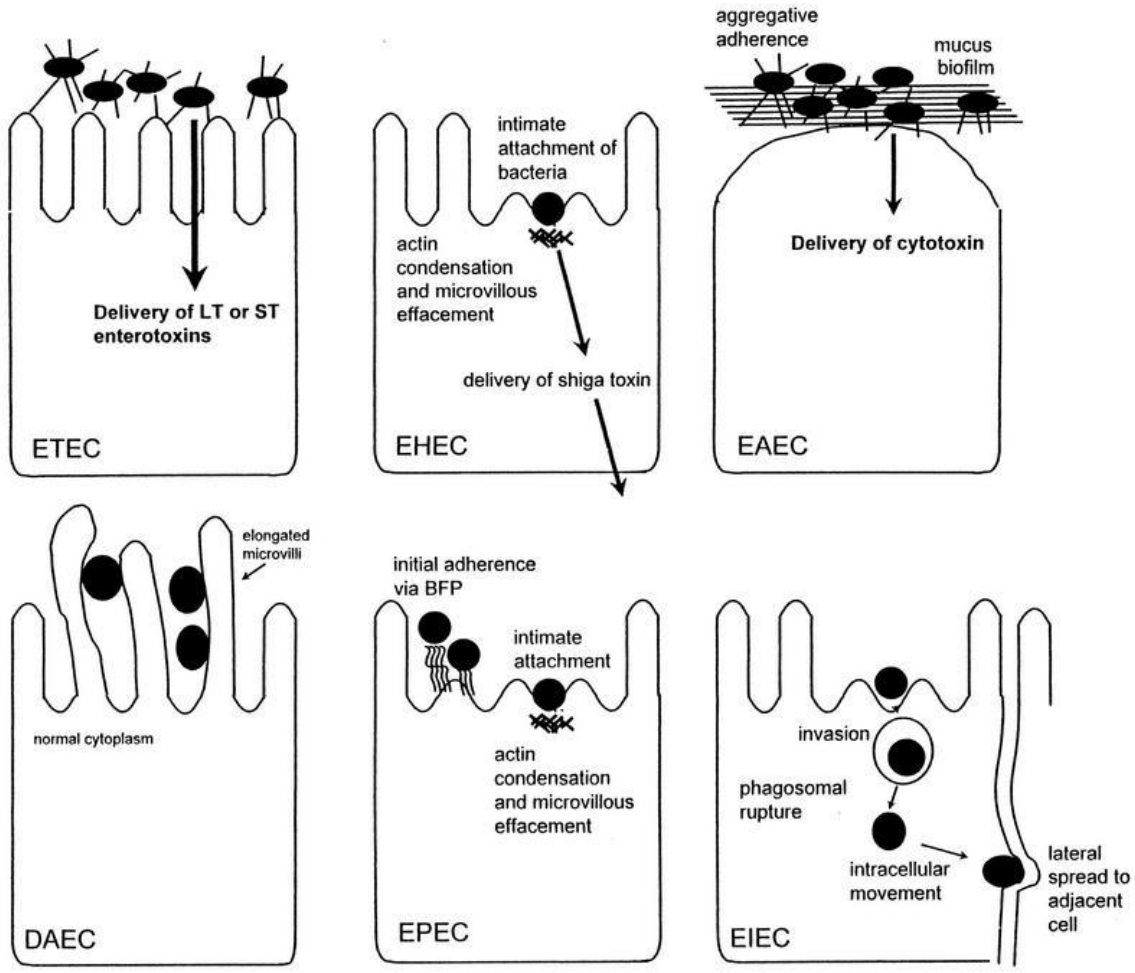


Figura 3: Patrons d'infeccións dels diferents patotips de les *E. coli* diarreogèniques. [16]

EAEC: És un patotipus caracteritzat per poseir una gran heterogeneitat a nivell de factors de virulencia. Aquests grup presenta un fenòmen d'adhesió a l'epiteli intestinal, creant un patró d'agregació característic, s'anomena de "maons apilats" i forma una pel·lícula o biofilm sobre l'epiteli. A més d'aquest mecanisme d'adherència, com les adhesines de les fímbries (AAF I, II, III IV) també és productor d'una toxina termo estable característica, l'EAST-1. I productora de *aatA* (que correspon a un fragment CVD432, que codifica per una proteïna de membrana, TolC). Finalment presenta el factor AggR associat a ser el major regulador de la virulència de les EAEC. [12, 17, 18]

Aquest patotip és un dels més important a nivell mundial, s'ha associat tant a diarrea endèmica en nens de països en vies de desenvolupament com països industrialitzats. També com a agent causal principal de diarrees epidèmiques, en diarrees del viatger i fins hi tot associat en diarrea persistent en pacients infectats pel VIH. [19] Fent

referència als símptomes clínics que provoca, es caracteritza per produir diarrea aquosa, vòmits, deshidratació i ocasionalment rampes abdominals, i aquests símptomes podent persistir durant més de 2 setmanes. [20]

ETEC: Principalment es caracteritza per la presència de la enterotoxina termolàbil LT i/o la enterotoxina termoestable ST. La seva unió a les cèl·lules epitelials de l'intestí prim està mediada per diversos factors de colonització. S'ha observat que les ETEC són capaces d'expressar altres factors de virulència, com per exemple tipus SPATE o EAST1. [12]

És un dels principals patògens causant de diarrea infantil endèmica esporàdica, i la majoria d'aquests estan associats a ETEC-ST. Globalment se li atribueixen 42.000 morts en nens menors de 59 mesos d'edat. [8] Els nens en edat escolar i adults de països desenvolupats solen tenir una molt baixa incidència d'infecció simptomàtica per aquest patògen. Les fonts més comunes d'infecció solen ser els aliments i l'aigua contaminats fecalment. [13] Encara que la infecció per ETEC es presenta amb més freqüència en nens, també és l'agent etiològic predominant que causa la diarrea del viatger entre els adults dels països desenvolupats que visiten àrees on la infecció d'ETEC és endèmica. Els estudis suggereixen que entre un 20 i 60% dels viatgers que presenten diarrea, ETEC n'és la causa. [16, 21, 22] Les diarrees causades per ETEC tenen una clínica característica, presenten un període d'incubació curt (de 14 a 50 hores) i amb un inici brusc. La diarrea és aquosa, en general, sense sang, moc o pus. Una minoria de pacients presenten febre i vòmits. [16]

EPEC: Aquest grup es caracteritza per la presència de 2 elements genètics: el plàsmid de factors d'adherència (EAF) que codifica per la proteïna BFP (bundle-forming pili) i l'illa de patogencitat LEE que codifica per una serie de factors de virulencia, entre ells la intimina (al gen *eae*). Aquests dos factors de virulencia, (BFP i intimina), juntament amb d'altres, estan implicats en els processos d'adherencia a l'epiteli intestinal de les EPEC. [12] Aquests patògens es classifiquen en 2 grups: les típiques (tEPEC) i les

atipiques (aEPEC). Les tEPEC es caracteritzen per tenir la presència de bfp+ i eae+, mentres que les aEPEC només tenen eae+. Malgrat això cal fer esment que el gen *eae* no és exclusiu de les soques EPEC, havent-se descrit freqüentment en soques EHEC i també a d'altres membres del genere *Escherichia,* com *E. albertii*. [23]

Els símptomes clínics de la diarrea causada per EPEC inclouen diarrea prolongada i no sanguinolenta, vomits i febre en infants. Aquesta infecció també s'ha associat a diarrea crònica, i en alguns casos s'ha relacionat amb seqüèles com la malabsorció intestinal, malnutrició, pèrdua de pes i fins i tot retard en el creixement. [16] En contrast amb la limitada importància que les EPEC tenen als països desenvolupats, és una de les causes més importants, sinó la primera, de diarrea infantil als països en vies de desenvolupament. Associant-se-li un número de morts de 79.000 nens menors de 59 mesos. [8] Estudis realitzats els darrers anys [24] indiquen que les aEPEC son més prevalents que les tEPEC, tant en el món desenvolupat, com en els països en vies de desenvolupament. I també son les aEPEC les més importants tan en brots eporàdics com en les diarrees en infants.

EIEC: Presenten la capacitat d'invasió amb penetració a la mucosa intestinal, causant una disenteria, i es presenta en adults i nens per igual. A nivells de símptomes clínics, son molt semblants als causats per *Shigella* spp., predominant per febre, dolor abdominal rampes, malestar i diarrea aquosa acompanyada de toxèmia; seguit la la fase de la diarrea aquosa, es caracteritzen per escasses deposicions que contenen generalment pus, moc i sang. [16]

EHEC: Es caracteritzen bàsicament per provocar diarrea aquosa, que progressa a diarrea amb sang, dolors abdominals i rampes. S'associa a brots de diarrea severa en paisos desenvolupats, on hi ha un major consum d'aliments càrnics. Es caracteritza per la producció de 2 toxines Stx1 o Stx2. [12] Causa el conegut síndrome uremic-hemolitic (HUS), més associat a Stx2, que pot acabar amb una fallada renal aguda, podent arribar a causar la mort de la criatura o el pacient. [16]

DAEC: Formen un patró difús de fixació en els enteròcits de l'intestí prim, que és produeix a través de fimbries d'adhesió. Es troba en menor freqüència tant en nens, entre 18 i 59 mesos, com en viatgers. També es troba associat a infeccions dels tracte urinari (UTIs) recurrents en adults. [12]

***SHIGELLA* spp.**

Els membres del gènere Shigella són bacils gramnegatius no mòbils, no fermenten la lactosa; són aeròbics facultatius de la família de les *Enterobacteriaceae*. [25] Existeixen quatre espècies de Shigella: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* i *Shigella sonnei.*

Les infeccions intestinals causades per *Shigella* spp. s'anomenen shigelosis; és un problema de salut pública important arreu del món, especialment en paisos de baixa renda, on es produeixen la inmensa majoria del total de casos (164.700.000 de casos/any). Se li atribueixen 1,1 milions de morts l'any i els nens de menys de 5 anys d'edat són els principals afectats.[26]

No obstant, cal fer esment que en estudis més recents se li atribueixen un nombre menor de morts, de l'ordre de 28.000, [8] situant-se després de EPEC i ETEC en número de casos amb desenllaços fatals. [8]

A nivell clínic causa, en un inici, diarrea aquosa i de volum abundant, seguit de deposicions amb menys volum però amb presència de mucus i sang. Sol presentar també dolors, rampes abdominals, febre i mareig. [27]

El principal mètode de transmissió és per contacte fecal-oral i és altament contagiós, amb un baix inòcul infecciós, essent precissos només 10 microorganismes per a causar la diarrea. [28]

PREVENCIÓ I TRACTAMENT DE LA DIARREA

La diarrea sol ésser una patologia autolimitant, tot i aquest fet la OMS dona un seguit de mesures per tal de prevenir-la: accés a aigua potable, bons serveis de sanejament, una recomanació de realitzar la lactància materna exclusiva durant els primers sis mesos de vida, una bona higiene personal i alimentària, una educació per a la salut sobre com es propaguen les infeccions, així com també si és possible realitzar una vacunació contra els principals patògens com seria rotavirus. [2]

Les mesures per al tractament de la diarrea son les següents:

Rehidratació:
Realitzar una bona rehidratació amb fluids intravenosos en cas de deshidratació severa o xoc i / o sals de rehidratació oral (SRO) per la deshidratació moderada és la opció més recomanada. SRO és una barreja d'aigua potable, sal i sucre, que es pot preparar de forma segura de manera domèstica a un cost molt baix, i que s'utilitza àmpliament per al tractament dels nens amb diarrea aguda. Això permet recuperar el líquid i els electròlits perduts en les defecacions. Des de que l'OMS va adoptar la SRO el 1978 com la seva principal eina per combatre la diarrea, la taxa de mortalitat dels nens que la pateixen s'ha reduït de 5.000.000 a 1.300.000 de morts anuals. [29]

Aliments rics en nutrients:
Prendre aliments d'elevat valor nutricional, ajuda a trencar el cercle viciós que existeix entre la malnutrició i la diarrea. És clau intentar que l'infant rebi una dieta nutritiva durant episodis de diarrea, com pot ser la llet materna, o es recomana en exclusiu durant els primers 6 mesos de vida als nens sans per evitar patir episodis de diarrea. [2]

Altres fàrmacs:
Les guies de tractament ESPGHAN / ESPID consideren l'ús de racecadotril, diosmectita, o probiòtics com a possible tractament conjunt a les SRO. També si la diarrea es

presenta sense febre important o amb presència de deposicions amb sang o pus, es pot prendre loperamida, que evita la motilitat intestinal. [11, 30]

Tractament amb antimicrobians:

En certs casos depenent la severitat, la duració dels símptomes i/o l'estat immunològic del pacient, pot requerir tractament amb antimicrobians. Els antimicrobians són usats sovint pel tractament d'enteritis severes, i de fet per la disenteria i la diarrea persistent en infants, la teràpia amb antibiòtics es sovint recomanada. [31] Els antibiòtics administrats de forma empírica per la diarrea del viatger s'ha vist que poden pal·liar els símptomes i escurçar la durada de l'episodi. [32]

Els antimicrobians més usats són les fluoroquinolones; altres agents com ara cotrimoxazole, ampicil·lina, amoxicil·lina més àcid clavulànic, azitromicina, o eritromicina (DV causades per *Campylobacter* spp.) també s'usen sovint. [32, 33] En el tractament de la DV les fluoroquinolones son els antibiòtics més recomanats, a excepció dels casos importats de l'Índia, on la resistència descrita a aquests antimicrobians és molt alta [34] i s'empren alternatives com la rifaximina (RFX) per exemple. [35] Hi ha nombrosos estudis que demostren que aquest antibiòtic pobrement abosrbible a nivell intestinal, és efectiu en tractament de la diarrea, així com també es proposat com a profilaxi en la DV. [36, 37] La profilaxi amb antimicrobians alhora de realitzar un viatge i per evitar patir la DV, esta recomanat sols a persones que patir un episodi o les seves conseqüències els pot ser contraproduent per la seva salut. Per exemple pacients amb aclorhídria, SIDA en etapa terminal o persones amb immunodeficiència, persones que han sofert trasplantaments, quimioteràpia, o pateixen hipogammaglobulinemia. També es recomenable la quimioprofilaxi en pacients amb alguna patologia crònica intestinal com podria ser per exemple: malalts de Crohn, colitis ulcerosa, o diarrea crònica. Se'ls hi suma pacients amb diabetis mellitus, insuficiència renal o estadis avençats d'infecció d'HIV, pacients amb colonostomies o ileostiomíes. [11]

A continuació en el comentari realitzat a la revista The Lancet Infectious Diseases, titulat “Prevention of travellers’diarrhoea: where and who?” es discuteix en més detall les implicacions de la profilaxi amb RFX per a la diarrea del viatger, i les posibles implicacions.

Prevention of travellers' diarrhoea: where and who?

Published Online
September 4, 2013
http://dx.doi.org/10.1016/
S1473-3099(13)70243-3
See Online/Articles
http://dx.doi.org/10.1016/
S1473-3099(13)70221-4.

In *The Lancet Infectious Diseases*, Philipp Zanger and colleagues[1] present their trial of rifaximin for diarrhoea prophylaxis in individuals travelling to south and southeast Asia. Diarrhoea is the most common illness affecting travellers to low-income and middle-income countries,[2,3] but its true relevance is that it is one of the most important causes of childhood morbidity worldwide.[4] Travellers' diarrhoea might point to the poor sanitation in the destination countries,[3,5,6] and it provides valuable indirect information about the causes and characteristics of diarrhoea-causing microorganisms in the visited areas.

Despite being a leading cause of death in children younger than 5 years, commonly, and especially in adults, diarrhoea is a self-limited disorder that does not usually need antibiotic treatment.[3] However, antibiotic prophylaxis might be needed for people with specific risk factors.[5,7]

When needed, quinolones have been used for diarrhoea prophylaxis. However, factors exist that compromise their use: the continuous increase in levels of microbial resistance to these antimicrobial drugs and the need to reserve them for other more serious infections.[5,8] In this context, rifaximin has been described as an alternative, because it is a semi-synthetic non-absorbable derivative of rifamycin that reaches extremely high concentrations in the intestinal lumen and is unable to cross the epithelium barrier towards the systemic circulation.[9] Indeed, in Zanger and colleagues' study, rifaximin was effective in prevention of diarrhoea in the study population: from departure to 7 days after return, rifaximin provided 48% protection (95% CI 16–68) by lowering the incidence of travellers' diarrhoea from 1·99 (1·50– 2·64) per 100 person-days in the placebo group to 1·04 (0·72–1·48) in the intervention group (incidence rate ratio 0·52, 95% CI 0·32–0·84; p=0·005).

Some factors could affect the usefulness of antibiotic prophylaxis of diarrhoea, such as the specific pathogens present in a geographical region and their pattern of antibiotic resistance. Regarding the pathogens causing invasive diarrhoea, rifaximin has good in-vitro activity against *Shigella* spp or *Salmonella* spp.[10] The protective action of rifaximin prophylaxis against experimental *Shigella* spp infections has been shown,[11] suggesting that rifaximin might kill *Shigella* spp before their entrance in the epithelium cells. Conversely, *Campylobacter* spp show a different scenario; thus, studies emphasise a constitutive rifaximin resistance.[10]

Studies assessing the activity of rifaximin against other relevant diarrheogenic pathogens such as *Escherichia coli* have had good outcomes in which both in-vitro and in-vivo findings show the effectiveness of rifaximin.[10,11] But the global phenomenon of antibiotic resistance and local resistance patterns should also be considered. Thus, in India and other regions in Asia, isolation of quinolone-resistant microorganisms is frequent and has lead to a change in diarrhoea treatment for travellers returning from these countries.[5,8,10] In the same way, levels of rifaximin resistance are unusually high in some countries.[12]

In our opinion, the geographical prevalence of invasive microorganisms, such as *Campylobacter* spp, and local data about levels of antimicrobial resistance should be considered before rifaximin is recommended for diarrhoea prophylaxis. However, data for antibiotic resistance are absent in some regions of the world, and efficient surveillance systems are scarce in some countries that do not have strong national health systems, especially in developing countries.[13] This fact, together with the non-use of rifaximin in many countries, means that further studies will need to be done to identify whether the prophylactic use of rifaximin might be compromised by the presence of specific resistance mechanisms.

Diarrhoea prophylaxis is mainly used in individuals travelling to developing countries. Because diarrhoea is a cause of child death in these countries, and microorganisms have shown high levels of antimicrobial resistance to available treatments, another factor should be considered: the direct effect of antibiotic use in the selection and emergence of antimicrobial resistance that results in the loss of use of an antibacterial drug before its introduction in the country, and in the indirect effect on other antibiotics because of co-selection of antibiotic resistance.[14] In this respect, the target population should be carefully selected to minimise the effect of this practice in local populations, who, in some cases, because of economic constrictions, are almost living in conditions that mimic the pre-antibiotic era.

Joaquim Ruiz, Maria J Pons
Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Barcelona 08036, Spain
joruiz@clinic.ub.es

We declare that we have no conflicts of interest.

1 Zanger P, Nurjadi D, Gabor J, Gaile M, Kremsner PG. Effectiveness of rifaximin in prevention of diarrhoea in individuals travelling to south and southeast Asia: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Infect Dis* 2013; published online Sept 4. DOI:10.1016/S1473-3099(13)70221-4.

2 Harvey K, Esposito DH, Han P, et al. Surveillance for travel-related disease—GeoSentinel surveillance system, United States, 1997–2011. *MMWR Surveill Summ* 2013; **62**:1–23

3 Kollaritsch H, Paulke-Korinek M, Wiedermann U. Traveler's diarrhea. *Infect Dis Clin North Am* 2012; **26**: 691–706.

4 WHO/UNICEF. Ending preventable child deaths from pneumonia and diarrhoea by 2025. The integrated Global Action Plan for Pneumonia and Diarrhoea (GAPPD). Geneva: World Health Organization, 2013.

5 Hill DR, Ericsson CD, Pearson RD, et al. The practice of travel medicine: guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2006; **43**: 1499–539.

6 Steffen R. Epidemiology of traveler's diarrhea. *Clin Infect Dis* 2005; **41** (suppl 8): S536–40.

7 DuPont HL, Ericsson CD, Farthing MJ, et al. Expert review of the evidence base for prevention of travelers' diarrhea. *J Travel Med* 2009; **16**: 149–60.

8 Mensa L, Marco F, Vila J, Gascón J, Ruiz J. Quinolone resistance among *Shigella* spp. isolated from travellers returning from India. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14**: 279–81.

9 Jiang ZD, Ke S, Palazzini E, Riopel L, Dupont H. In vitro activity and fecal concentration of rifaximin after oral administration. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 2205–06.

10 Sierra JM, Ruiz J, Navia MM, Vargas M, Vila J. In vitro activity of rifaximin against enteropathogens producing traveler's diarrhea. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 643–44.

11 Taylor DN, McKenzie R, Durbin A, et al. Rifaximin, a nonabsorbed oral antibiotic, prevents shigellosis after experimental challenge. *Clin Infect Dis* 2006; **42**: 1283–88.

12 Gomes C, Ruiz L, Pons MJ, Ochoa TJ, Ruiz J. Relevant role of efflux pumps in high levels of rifaximin resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2013; **107**: 545–49.

13 Grundmann H, Klugman KP, Walsh T, et al. A framework for global surveillance of antibiotic resistance. *Drug Resist Updat* 2011; **14**: 79–87.

14 Cantón R, Ruiz-Garbajosa P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr Opin Pharmacol* 2011; **11**: 477–85.

RESISTÈNCIA A ANTIMICROBIANS

IMPORTÀNCIA DE LA RESISTÈNCIA A ANTIMICROBIANS

La resistència a antimicrobians esta considerada com un problema de salut de gran rellevància a nivell mundial, havent estat classificat per l'Organització Mundial de la Salut com un dels problemes prioritaris. [38]

S'ha estimat que el risc de mort en pacients amb infeccions causades per bacteris resistents als antibiòtics és més gran en comparació amb pacients amb infeccions causades per microorganismes no resistents. [39] Només a Europa, s'ha calculat que aproximadament més de 25.000 morts es deuen a infeccions per microorganismes resistents als antibiòtics i el cost econòmic relacionat d'aquestes infeccions és superior a 1,5 milions d'euros cada any. [40] De la mateixa manera, el Centre per al Control i la Prevenció de Malalties (CDC) ha estimat que, més de 2 milions d'infeccions i 23.000 morts a l'any, són causats per infeccions de microorganismes resistents, només als EUA. [41]

L'aparició de resistències redueix dramàticament les opcions de tractar les infeccions de manera efectiva i augmenta el risc de complicacions i de desenllaços fatals. [42]

L'any 2001, l'OMS va dissenyar una estratègia mundial per a la contenció de la resistència als antimicrobians. En aquest sentit es va establir un marc d'intervencions per retardar l'aparició i reduir la propagació de microorganismes resistents als antimicrobians, que es citen a continuació:

(1) reducció de la càrrega de la malaltia i la propagació de la infecció

(2) millorar l'accés als antimicrobians apropiats

(3) la millora de l'ús dels antimicrobians

(4) l'enfortiment dels sistemes de salut i les seves capacitats de vigilància

(5) l'aplicació de la reglamentació i la legislació

(6) fomentar el desenvolupament de nous fàrmacs i vacunes apropiats.

Malgrat aquests esforços, la resistència als antimicrobians segueix sent una amenaça global, els nivells de resistència a antimicrobians segueixen augmentant a nivell mundial i de manera generalitzada, fent que la majoria d'agents antimicrobians utilitzats en l'actualitat siguin ineficients o amb poc marge d'actuació. El panorama és pitjor si li sumem l'escàs nombre de noves molècules antibacterianes que estan en desenvolupament actualment, sobretot en el que fa a molècules de noves famílies estructurals. [39]

L'ús d'agents antibacterians, ja sigui de forma correcta o incorrecta tan en humans com en veterinària, pot desenvolupar resistència en microorganismes, ja sigui per selecció de mutacions cromosòmiques, o per l'adquisició d'elements genètics que codifiquen mecanismes de resistència a antibiòtics. Aquests determinants poden estar presents tan en microorganismes comensals com poden ser adquirits a través de la cadena alimentària o interaccions amb l'ambient. Destacar també la capacitat dels determinants de resistència de moure's entre bacteris.

COM S'ADQUIREIX O ES DISSEMINA LA RESISTÈNCIA A ANTIMICROBIANS

Després de la introducció dels antibiòtics es va assumir que l'evolució de la resistència als antibiòtics era poc probable. Això es va basar en el supòsit que la freqüència de mutacions generadores de bacteris resistents va ser insignificant. [43] Per desgràcia, el temps ha demostrat el contrari. Ningú preveu inicialment que els bacteris reaccionarien a l'exposició als antimicrobians, adaptant-se als canvis de l'entorn mitjançant el desenvolupament de resistència als antibiòtics, i utilitzant una àmplia varietat de mecanismes. D'altra banda, la capacitat dels bacteris per intercanviar gens (transferència horitzontal) també fou un fenomen que sorprengué a la comunitat científica. Així, la taxa d'aparició de la resistència al bacteris està determinada per la combinació de 2 factors: la taxa d'aparició de mutacions *de novo* i la capacitat de transferència horitzontal d'aquests gens de resistència. [42, 44] S'ha demostrat que l'aparició de resistència en realitat va començar abans que el primer antibiòtic s'introduís a la pràctica clínica, degut principalment a que molts antibiòtics són produits per bacteris de manera natural. Així, per exemple en el cas de la penicil·lina,

es va identificar una *E. coli* que posseïa una β–lactamasa abans de que aquest antimicrobià fos introduït a la pràctica mèdica. [45, 46]. Fins hi tot en estudis recents s'ha analitzat material genètic de fa 30.000 anys, i en ell s'han trobat gens de resistència a β-lactàmics, tetraciclines i glicopèptids. [47]

Cal destacar que el fenomen més important, que s'ha demostrat en nombrosos estudis, és que el consum d'antibiòtics contribueix a l'aparició i/o selecció d'aquests mecanismes de resistència en els bacteris. [40, 41]

Això ha permès als bacteris crear unes estratègies concretes per adquirir resistència als antimicrobians, i s'agrupen principalment segons les accions que realitzen. Les detallem a continuació: [44](Figura 4)

- Canvis en la permeabilitat de la paret cel·lular bacteriana que restringeixen l'accés als antimicrobians
- Expulsió activa de l'antibiòtic fora de la cèl·lula bacteriana
- Modificació enzimàtica de l'antibiòtic
- Degradació de l'agent antimicrobià
- Segrest del l'agent antimicrobià
- Adquisició de les vies metabòliques alternatives a les inhibides pel fàrmac
- Modificació de les dianes dels antibiòtics
- La sobreproducció o subproducció de l'enzim diana

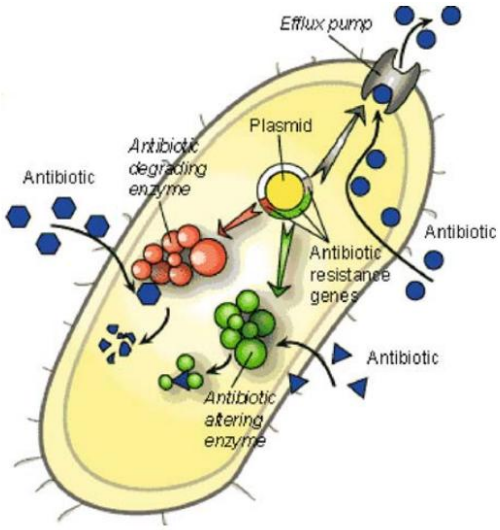


Figura 4: Estratègies de com el bacteri fa l'antimicrobià ineficaç. (Figura adaptada http://www.chembio.uoguelph.ca)

Així doncs, s'ha descrit que les mutacions més comunes repercuteixen a alteracions en la diana d'actuació dels antibiòtics i en l'augment de la sortida del fàrmac del bacteri. Tot i aquest fet, l'aparició de resistències s'associa també a una major expressió de determinats gens implicats en la resistència, alteracions a l'expressió de les dianes d'acció dels antibiòtics o alteracions en la producció d'enzims amb capacitat d'inactivar els antimicrobians. [42]

Aquest fet cal sumar-li la capacitat que tenen els gens de resistència de moure's (transferència), és a dir, adquirir elements genètics mòbils d'altres microorganismes, ja sigui de la mateixa espècie o d'espècies diferents, com són els plasmidis, els integrons (tot i que per ell sols no es mobilitzen) i els transposons.

A part es summa les aparicions *de novo* de mutacions en l'ADN bacterià, que es poden veure afavorides i potenciades per l'ús d'antimicrobians, poden fer que els bacteris estiguin en avantatge ecològic, i no sempre impliquen un cost extra en la fitness del bacteri. [42, 48, 49]

Elements genètics mòbils:

Els gens de resistència a antibiòtics adquirits pels bacteris són freqüentment continguts dins d'ADN mòbil, que es pot definir en termes generals com qualsevol segment d'ADN que és capaç de translocar-se d'una part d'un genoma a un altre o entre genomes diferents. Aquests mecanismes o determinants de resistències associats a la transferència de material genètic, porten informació principalment per generar modificacions dels antibiòtics, protecció de la diana d'acció, la substitució d'objectius farmacològics susceptibles o l'adquisició de noves bombes d'expulsió. [42]

Els principals processos protagonistes de la transferència horitzontal de material genètic entre bacteris són: la conjugació i la transformació, tot i que també hi ha la transducció. [50]

- CONJUGACIÓ

Intercanvi de material genètic entre bacteris utilitzant els elements propis de conjugació com serien els plasmidis o transposons.

- TRANSFORMACIÓ

Aquest procés es caracteritza bàsicament per la capacitat que presenten els bacteris d'incorporar material genètic extern al seu, i mitjançant recombinacions o altres processos, introduir aquest nou material a la cèl·lula receptora. El procés es produeix en bacteris tant grampositius com gramnegatius. Als bacteris que presenten la capacitat d'incorporar aquest material genètic exògen, se'ls anomena "competents".

En aquest procés la molècula d'ADN penetra als bacteris receptors i es incorporat al genoma del bacteri hoste per recombinació homòloga o transposició. Alternativament, la molècula d'ADN pot ser capaç de replicar-se de forma autònoma, com per exemple, en el cas dels plasmidis.

- TRANSDUCCIÓ

La transducció és un procés en el qual les partícules de fag s'empaqueten amb l'ADN bacterià en lloc del fag. En aquest procés també es poden mobilitzar gens de resistència. [51]

Els plasmidis

Els plasmidis són elements d'ADN circular extra cromosòmic, a part del propi material genètic del bacteri, i es caracteritza per poder replicar-se de forma autònoma, és a dir, per contenir el seu propi origen de replicació. La mida dels plasmidis sol ésser variable, d'entre 1 a més de 1000 kpb. Aquestes estructures de material genètic s'han trobat en gairebé tots els gèneres bacterians i van des d'elements simples que només contenen un origen de replicació i gens que codifiquen les funcions de replicació, a estructures complexes que contenen gens de resistència. [52] [53]

Alguns plasmidis tenen un ampli ventall de receptors i es poden transferir entre diferents espècies, mentre que altres tipus tenen menys hostes com a receptors, limitant-se a un sol gènere o fins hi tot una sola espècie.

Els plasmidis han evolucionat com una part integral del genoma bacterià, i es caracteritzen per proporcionar funcions addicionals al seu hoste. En molts casos, posseir un plasmidi representa un avantatge selectiu, ja que porta gens que confereixen un fenotip tal com resistència als antimicrobians. D'aquesta manera els gens de resistència que es troben en plasmidis ofereixen avantatge al bacteri en el cas que hi hagi un ambient de pressió antimicrobiana. [54] [53]

S'han descrit diferents grups de plasmidis, que confereixen també resistència, que no poden coexistir en una mateixa cèl·lula bacteriana; així plasmidis amb el mateix sistema de control de replicació no poden "coexistir" en el mateix bacteri, d'altra banda, plasmidis amb diferents sistemes de control de replicació, si són compatibles en un microorganisme. [55] Aquest fet va donar lloc a la divisió dels plasmidis en grups d'incompatibilitat [56] i aquests grups s'han definit sobre la base de la relació genètica

i l'estructura del pilus, [57], essent els grups: IncFIA, IncFIB, IncFIC, IncHI1, IncHI2, IncI1, IncL/M, IncN, IncP, IncW, IncT, IncA/C, IncK, IncB/O, IncX, IncY, IncF, els que circulen més freqüentment entre les *Enterobacteriaceae*. [53, 55] I s'ha mostrat una major prevalença de 4 families palsmídiques: IncF, IncI1, IncA/C i Inc HI2, en col·leccions de soques d'Enterobacteriaceae resistents. [54]

Els transposons

Els transposons conjugatius, com els plasmidis de conjugació, han de contenir un origen de transferència i els gens necessaris per fer l'aparell de conjugació. A diferència de plasmidis aquests elements no contenen un origen de replicació i s'han d'inserir en un replicó amb la finalitat de ser mantingut. Aquest replicó pot ser tant del plasmidi com del cromosoma. Aquesta característica dóna un avantatge sobre els plasmidis, ja que no ha de tenir maquinària de replicació que sigui compatible amb la cèl·lula receptora, i per tant sembla que té més capacitat per disseminar-se en diferents hostes que els plasmidis, ja que no presenta cap limitació. Així com els plasmidis, els transposons també són elements importants que ajuden a difondre els gens de resistència entre els bacteris.

Els integrons

Els integrons són elements genètics que es caracteritzen per posseir components d'un sistema de recombinació específica de lloc que els permet capturar i mobilitzar els gens, incloent gens de resistència. Posseeixen un gen *int*, que codifica una integrasa específica de lloc, de la família tirosina recombinasa, que porta a terme la recombinació entre dos llocs diana diferents. La transferència entre bacteris dels integrons sol ser a través de plasmidis o transposons. [58]

Els gens *Int* s'han utilitzat com a base per agrupar els integrons en l'actualitat; es reconeixen varies "classes": els que porten *int1* es defineixen com a classe 1*, int2* com de classe 2 , *int3* com a classe 3, i *int4* com classe 4. [59] Tot i que descrits hi ha reportats 9 tipus diferents d'integrons. [58]

Aquests elements d'ADN han estat reportats en alta freqüència en microorganismes resistents a antimicrobians i s'han aïllat en bacteris de diferents orígens, tant d'animals com en humans. Els integrons posseeixen un rol important en la disseminació de la resistència als antibiòtics, per la seva capacitat de transportar un o varis gens cassette donant lloc a la disseminació de les resistències i a l'efecte de la co-resistencies on gens de resistència a diferents antimicrobians es mouen en bloc, conjuntament. Aquest fet pot donar que només amb l'ús d'un antimicrobià es seleccionin diferents gens de resistència en els bacteris de la zona, fent que existeixin i romanguin gens de resistència en una zona sense que s'utilitzi l'antibiòtic determinat. [58]

En general, la capacitat dels elements genètics mòbils que contenen gens de resistència a antimicrobians a difondre's per l'ambient, és modulada per una sèrie de factors: les pressions selectives del medi ambient, factors del propi hoste, així com les propietats intrínseques dels mateixos elements genètics.

DESCRIPCIÓ DE LES PRINCIPALS FAMILIES D'ANTIMICROBIANS I LES SEVES RESISTÈNCIES

El descobriment i la producció d'antibiòtics en la primera meitat del segle passat ha estat un dels majors èxits de la medicina. L'ús d'agents antimicrobians ha reduït la morbiditat i la mortalitat dels humans i ha contribuït substancialment a l'augment de l'esperança de vida de l'ésser humà. Els antibiòtics s'usen tan com a agents terapèutics o com a agents profilàctics en humans, així com també són àmpliament utilitzats en pràctiques agrícoles o veterinàries.

El primer compost antimicrobià descobert va ser la penicil·lina, per Flemming l'any 1929. Poc després d'aquest important descobriment, l'ús d'antimicrobians es va estendre ràpidament. Avui en dia, les diferents classes d'agents antimicrobians es coneixen i es classifiquen en funció dels seus mecanismes d'acció. [60] A continuació els principals mecanismes descrits:

- Interfereixen en la síntesi o dany de la paret bacteriana, com els β-lactàmics, els glicopèptids o les fosfomicines.
- Inhibeixen en el procés de la síntesi proteïca, com els aminoglicòsids, les tetraciclines, els macròlids, el cloramfenicols, l'estreptomicina o la rifampicina.
- Interfereixen en la síntesi de l'àcid fòlic com les sulfonamides i el trimetroprim.
- Interaccionen en la síntesi dels àcids nucleics com les quinolones.

Les tetraciclines:

Aquesta família d'antimicrobians és d'origen natural, es produeixen com a metabòlit secundari en diferents espècies del gènere *Streptomyces*. Són unes molècules molt actives davant un gran ventall de bacteris i basen el seu mecanisme d'acció en unir-se al ribosoma bacterià, concretament a la unitat 30S que interactua amb el 16 S, i com a conseqüència evita la unió del *tRNA*, inhibint així la síntesi proteica del bacteri.

Les tetraciclines s'han usat àmpliament pel tractament d'infeccions en humans, però també com a antibiòtic molt emprat en veterinària i també com a factor de creixement. [61]

Mecanisme de resistència

El mecanisme de resistència més comú de les tetraciclines és l'ús de les bombes d'expulsió, codificats en els gens *tet*A, *tet*B, *tet*C, *tet*D, *tet*E, *tet*I i *tet*Y. Encara que existeixen altres mecanismes, com per exemple la protecció ribosomal i una acció enzimàtica que inactiva l'antibiòtic, codificat en d'altres gens *tet*. [62] [61]

Aminoglicòsids

Els aminoglicòsids són antibiòtics que inhibeixen la síntesi de proteïnes i / o alteren la integritat de les membranes cel·lulars bacterianes. [63] Tenen un ampli espectre d'acció i sovint actuen en sinergia amb altres antibiòtics, freqüentment amb β-lactàmics. El primer antibiòtic aminoglicòsid descobert fou l'estreptomicina l'any 1944. [64]

Posteriorment s'intruduïren un gran nombre de nous antibiòtics a la pràctica clínica, com la kanamicina, la gentamicina o la tobramicina entre d'altres.

Mecanismes de resistència:

S'han descrit diversos mecanismes de resistència a aminoglicòsids:

- Alteracions en la permeabilitat de la membrana: [65]

Es produeix una disminució de l'acumulació de l'antibiòtic dins el bacteri per alteracions de la permeabilitat de la membrana. Aquest mecanisme sol tenir poca importància en clínica.

- Alteració ribosoma (mutacions a la diana): [66]

Presencia de mutacions als gens codificants per les proteïnes de la subunitat ribosòmica 30S, que és el lloc d'acció de l'aminoglicòsid, fent disminuir l'afinitat d'aquest.

- Inactivació per enzims modificadors d'aminoglicòsids (EMAG)

El bacteri produeix uns EMAG que modifiquen l'aminoglicòsid i aquest no es pot unir al ribosoma. Aquest mecanisme és de gran rellevància en clínica, podent arribar a produir elevats nivells de resistència i s'han classificat en tres classes principals segons el tipus de modificació: les AAC (N-acetiltransferases), les ANT (O-nucleotidiltransferases) i les APH (O-fosfotransferases). [67] [44]

Els Fenol (Cloramfenicol)

El cloramfenicol és un antibiòtic d'ampli espectre de gran ús en humans i veterinària, actiu en bacteris grampositius, gramnegatius, així com també davant *Chlamydia*, *Mycoplasma* o *Rickettsia*.

El seu mecanisme d'acció es basa en ser un inhibidor de la síntesi proteica del bacteri, evitant l'elongació de la cadena de pèptid ja que s'uneix de manera reversible al centre del ribosoma 50S. [68]

Mecanismes de resistència:

Dins de l'existència de diferents mecanismes de resistència al cloramfenicol, els mecanismes reportats més sovint són els relacionats amb d'inactivació enzimàtica per acetilació mitjançant diferents enzims tipus cloramfenicol acetiltransferasas (*cat*). A més a més, la resistència pot estar mediada per alteracions de la permeabilitat de la membrana, és a dir, sistemes específics d'expulsió de l'antibiòtic o els seus derivats com els florfenicols, i aquests estan relacionats amb els gens *cml*A i *flo*R. [44, 68] Tanmateix s'han descrits alteracions al ribosoma que també condueixen al desenvolupament de resistència, amb la presència de mutacions o de metilacions a punts especifics del *23s rRNA*. [44]

En general en enterobacteris la descripció de gens de resistència està relacionat amb alteracions de la permeabilitat, com són *floR* i *cmlA*, i són poc freqüents en relació a la distribució del gen *cat.* [69]

Els β-lactàmics

Aquesta família d'antimicrobians es caracteritza per tenir un mecanisme d'acció que interfereix en les darreres fases de la síntesi del peptidoglicà, component necessari per la formació de la paret bacteriana. [44] Presenten baixa toxicitat perquè tenen una

diana específica de bacteris, la paret bacteriana. I és així perquè l'anell β-lactàmic característic d'aquest grup d'antimicrobians presenta una estructura similar a l'estructura D-alaninaD-alanina del peptidoglicà, i competeix de manera directe per la unió amb l'enzim PBP, no deixant que el bacteri sintetitzi la paret i produint-li la mort. [70]

Els β-lactàmics es divideixen en diferents classes: penicil·lines, inhibidors dels β-lactamases, cefalosporines, monobactams i carbapenems.

Mecanismes de resistència:

El principal mecanisme implica la hidròlisi enzimàtica dels β-lactàmics i s'anomenen β-lactamases. Es caracteritzen per hidrolitzar l'enllaç amida del nucli β-lactàmic i així inactivar l'antibiòtic abans de que pugui realitzar el seu efecte. [71]

Es classifiquen en diferents grups, els gens *bla*, i actualment s'han descrit més de 200 tipus. [70] Els enzims descrits més habituals dins d'enterobacteris són: bla_{TEM} (descrits fins al moment 211 al·lels), bla_{SHV} (fins a 182 al·lels), bla_{OXA} i bla_{CARB}. (www.lahey.org/Studies).

En els darrers anys hi ha hagut una dispersió a nivell mundial d'aquests mecanismes de resistència, sobretot de β-lactamases d'àmpli especte (BLEE). Aquests es caracteritzen per crear resistències davant les oximino-cefalosporines sobretot, i es destaca l'èxit de l'expansió mundial de bla_{CTX-M} [72] i, en els darrers anys, les carbapenemases. [73]

Els macròlids

Els macròlids actuen mitjançant la inhibició de la síntesi de proteïnes. S'uneixen a la subunitat 50S del ribosoma bloquejant el procés de traducció de l'ARN missatger (ARNm). Per tant estimulen la separació prematura de les cadenes de pèptids en formació, provocant a posterior la mort cel·lular. [74] L'ús dels macròlids ha augmentat considerablement en els últims 20 anys, i entre els seus membres més usats són l'etromicina i més recentment l'azitromicina. [75]

Mecanismes de resistència:

S'han descrit diferents mecanismes de resistència tant en grampositius com gramnegatius. Els diferents mecanismes de resistència afecten de manera diferent segons l'estructura dels macròlids (14, 15 i 16 àtoms), poden ser constitutius o que la seva expressió sigui induïble. La ubicació dels gens de resistència pot ser en el cromosoma o pot estar associat a elements mòbils que faciliten la seva dispersió. Els principals mecanismes de resistència als macròlids poden ser agrupats en: modificació de la diana, inactivació enzimàtica i alteracions de la permeabilitat.

Els més importants són probablement els codificats en elements mòbils, com ara *ere*(A), *ere*(B), *mph*(A), entre d'altres. No obstant això també s'han descrit altres mecanismes, com ara mutacions puntuals a als gens *rplD*(L4), *rplV*(L22), i *rrlH*(23ARN), així com el possible paper de l'azitromicina per actuar com un substrat d'alguns bombes d'expulsió cromosòmica. [75] En el cas de les mutacions al gen *rrl*H, malgrat són de gran importància a alguns microorganismes com per exemple *Bordetella pertussis*, [76] la seva importància clínica pel que fa als membres de la familia *Enterobacteriaceae* és poca, doncs, aquests posseeixen diverses copies d'aquest gen, el que farà necessari que s'afectin varies còpies per donar un fenotip resistent a macròlids.

Les sulfonamides

Les sulfonamides han estat àmpliament usades tant en medicina humana com en veterinària, des de la seva introducció a l'any 1935. Això va generar l'aparició ràpida de resistències i es van començar a usar de manera combinada amb les diaminopirimidines com és el cas del trimetroprim.

El mecanisme d'acció de les sulfonamides és inhibir la síntesi d'un compost clau en la síntesi de l'àcid fòlic, el dihidropteroat. Mentres si que observem com actua el trimetroprim, veiem que inhibeix l'enzim dihidrofolat reductasa (*dfr*), un altre enzim implicat en la via de l'àcid fòlic. [44, 77, 78]

Mecanismes de resistència:

En el cas del sulfametozaxol s'han reportat els gens sul1, sul2 i sul3, relacionats amb integrons, que codifiquen formes mutades de la dihidropteroato sintasa que no poden ser inhibides per l'antibiòtic en qüestió. El mateix succeeix en el cas del trimetoprim, on s'han reportat varies variants del gen *dfr*, que generen resistència a l'antibiòtic. [77-79]

Les quinolones

Les quinolones són una família d'antimicrobians que foren introduïts a la pràctica clínica l'any 1967. [80] Aquest compost fou descobert de manera casual com a subproducte en el procés de síntesi de l'antimalàric cloroquina. [81] Modificacions en l'estructura de la primera quinolona, va donar lloc a una primera generació de quinolones, incloent àcid pipemídic; aquests compostos però presentaven una activitat limitada envers microorganismes grampositius i presentaven limitacions en la seva penetració a teixits. El fet d'unir un àtom de Fluor al C-6 i una piperazina diamina cíclica al C-7 va generar la creació de la primera fluoroquinolona, la norfloxacina, amb activitat també davant bacteris grampositius. (Figura 5) [82]

Les quinolones es divideixen en quatre generacions:

Primera generació: àcid nalidíxic i àcid pipemídic

Segona generació: norfloxacina, ciprofloxacina, ofloxacina, pefloxacina

Tercera generació: lomefloxacina i levofloxacina

Quarta generació: gatifloxacina i moxifloxacina

En l'actualitat, les quinolones es caracteritzen per presentar un ampli espectre d'acció, amb ràpida acció bactericida i una baixa toxicitat, podent-se administrar tan oral com parenteralment i essent útils per tractar tant infeccions comunitàries com d'origen hospitalari. [83] S'utilitzen com a tractament d'elecció envers patologies de varis orígens: malalties respiratòries, infeccions gastrointestinals, malalties relacionades amb la pell, tuberculosis, infeccions urinàries i infeccions de teixits tous. Des de la seva introducció, les quinolones s'han convertit en un dels antibiòtics més usats a nivell mundial. [84]

Les quinolones penetren a l'interior de la cèl·lula per un sistema de difusió passiva. Sembla ser que les quinolones penetren a través de la bicapa lipídica (les més hidrofòbiques), o a través de les proteïnes de membranes utilitzant les porines (les més hidrofíliques). [85] Actuen inhibint l'acció de les proteïnes implicades en la replicació i transcripció de l'ADN, en concret l'ADN Girasa i la Topoisomerasa IV, que són els enzims diana. [86, 87] L'ADN Girasa i la Topoisomerasa IV, dos enzims que presenten una gran homologia entre ells, són tetràmers (A_2B_2) formats per dues subunitats A i dues subunitats B. L'ADN Girasa conformada per les subunitats GyrA i GyrB, codificades pels gens *gyrA* i *gyrB* respectivament i la Topoisomerasa IV per ParC i ParE codificats pels gens *parC* i *parE* respectivament. El mecanisme d'acció de les quinolones consisteix en la formació d'un complex quinolona-enzim-ADN, el qual bloqueja l'acció habitual de l'enzim. Això provoca una inhibició en la síntesi de l'ADN bacterià i per tant acaba provocant la mort cel·lular. La hipòtesi més ferma és que la quinolona interacciona amb les posicions 83 o 87 de GyrA o les posicions 80 i 84 en ParC d'*E. coli.* [88, 89] D'aquesta manera, el radical en posició 1 establiria interaccions hidrofòbiques amb la posició 83 de GyrA i amb la 80 de ParC, mentres que el radical en posició 7 interactuaria, per atracció de càrregues amb els aminoacids 87 i 84 de GyrA i ParC respectivament. Tanmateix, de manera més recent, estudis de modelatge molecular han proposat que el radical en posició 3 seria un altre punt d'ancoratge que podria establir interaccions amb els aminoacids 121 de GyrA i 117 de ParC. [90]

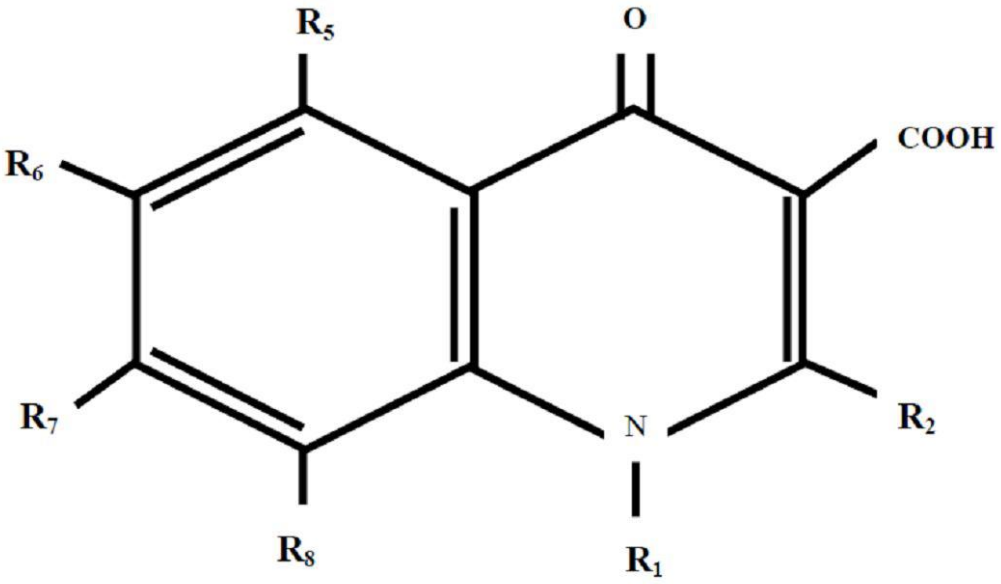


Figura 5: Estructura bàsica de les quinolones. (tesi Dr.Joaquim Ruiz)

Mecanismes moleculars de resistència a quinolones

L'ús, o sovint abús, d'aquests antimicrobians ha portat a l'aparició i/o selecció de soques resistents a quinolones. Seguidament es descriuen els mecanismes més freqüents de resistència:

1- Mutacions als enzims diana:

S'han descrit diferents canvis aminoacídics a les proteïnes GyrA, GyrB i ParC, ParE que comporten l'adquisició de resistències a quinolones. [91, 92]

ADN Girasa, mutacions al gens *gyrA* i *gyrB*: Els canvis descrits en la proteïna GyrA es troben principalment localitzats entre les posicions 67 i 106 de la proteïna. S'han descrit mutacions en aquest gen que confereixen resistència, especialment en la posició 83 i 87, que són les que tenen més importància a nivell clínic; la resta de mutacions s'ha descrit només de forma esporàdica o *in vitro*. En *gyrB* només s'han detectat 2 posicions que donen resistència, Asp-426 i Lys-447, i s'ha vist que la freqüència de mutacions, sobretot en mostres clíniques, és molt menor que al gen *gyrA*. [93]

Topoisomerasa IV, mutacions als gens *parC* i *parE:* En el cas de *parC* les mutacions més comunes s'han trobat als codons 80 i 84, i s'ha descrit que confereixen nivells de resistència moderats i alts. En el cas del gen *parE*, sembla que la seva importància, si mes no pel que a fa a microorganismes gramnegatius, és mínima en el desenvolupament de resistències a quinolones. [84, 94]

2- Disminució en l'acumulació de quinolones:

Porines: Una alteració en els gens que codifiquen per les porines comporta canvis en la permeabilitat de la cèl·lula. Aquestes proteïnes generen canals de difusió on entren les quinolones segons mida i càrrega. Sembla que l'adquisició de resistències succeeix quan hi ha una reducció de l'expressió de la porina OmpF, la porina principal de la membrana externa d'*E*. coli. [95]

Bombes d'expulsió: El sistema de bombes d'expulsió sembla tenir una funció com a sistema de detoxificació del bacteri, fent que l'expulsió d'antibiòtics es doni de manera col·lateral i poc específica. La majoria de sistemes d'expulsió activa estan acoblats al potencial de membrana. Es coneixen diverses families de bombes d'expulsió, que es classifiquen en funcio de llur estructura i mecanisme de funcionament, pel que fa a la resistencia a quinolones les principals bombes descrites pertanyen a les families: ABC, RND i MFS. [96]

3- Mecanismes transferibles de resistència a quinolones (TMQR)

Qnr

El gen *qnr* (*de "quinolone resistance"*) codifica per una proteïna Qnr que pertany a una família de pentapèptids repetits que es caracteritza per presentar repeticions en tàndem (Ser, Thr, Ala o Val)- (Asp o Asn)- (Leu o Phe)- (Ser, Thr o Arg)-(Gly). La seva funció consisteix en desestabilitzar el complex que formen la ADN Girasa i la Topoisomerasa IV amb la quinolona, fent que aquest antimicrobià no realitzi el seu efecte. Aquesta acció comporta un nivell baix de resistència a aquests antibiòtics, però es pensa que això facilitaria l'aparició de mutacions secundàries, i d'aquesta manera l'adquisició de majors nivells de resistència. Es coneixen 6 gens *qnr* diferents: *qnrA, qnrB,qnrS*, *qnrC*, *qnrD* i *qnrVC*, a més dins d'aquests s'ha descrit diverses variants. (www.lahey.org/qnrstudies/) [97, 98]

El primer TMQR descrit fou *qnrA* en una soca de *Klebsiella pneumoniae* l'any 1994.

Estudis posteriors realitzats en mostres dels anys 80, van descriure altres al·lels del gen *qnr* com *qnrB8*-like i *qnrB9*-like. [99] En l'actualitat aquest gen, *qnrB*, és dels TMQR més freqüents. [100]; [101] Darrerament s'ha proposat la creació d'una nova familia: *qnrVC*, mitjançant una carta a la revista de divulgació científica: Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, amb el títol "*QnrVC*, a new transferable *Qnr*-like family".

Despres de la publicació de la citada carta, el gen QnrVC, i els seus al·les, varen ser incorporats a la pagina oficial dedicada a la nomenclatura del gens *qnr* (www.lahey.org/qnrstudies/)

Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013;31(3):191–194

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc

Cartas científicas

QnrVC, a new transferable Qnr-like family

QnrVC, una nueva familia Qnr transferible

Dear Sir,

QnrVC, was described in 2008, within an integron environment in *Vibrio cholerae*.[1] Further studies have described QnrVC-like sequences, either in *V. cholerae* or other microorganisms, located within integrons or plasmids, some of them able to be transferred within microorganisms.[2–7]

This work analyses the phylogenetic relationships of QnrVC respecting the 5 established plasmid-encoded Qnr-families, searching GenBank for QnrVC-related sequences.[8]

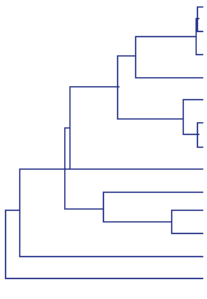
A GenBank search was performed using the nucleotide (GenBank: EU436855) and amino acid (GenBank: ACC54440.2) sequences of QnrVC1/VC3 as template, selecting those sequences with identities levels higher than 70% with respect to QnrVC1/VC3.[8]

Those selected sequences and representative sequences of the established Qnr-families present in http://www.lahey.org/qnrStudies, were included in the phylogenetic studies.

The BIOEDIT software was used to perform an *in silico* alignment to establish the presence of the characteristic loops A and B structures.[9]

Ten different Qnr sequences, which following established criteria[8] may be classified within a common family together QnrVC1/VC3, were found in GenBank (Fig. 1). Thus, 6 chromosomal-encoded sequences (ADI81040 and EGQ95960 from *V. cholerae*; YP132629 and EAS42881 from *Photobacterium profundum*; EGU51872 or EEX92304 from *Vibrio orientalis*; YP_002263022 from *Allivibrio salmonicida*: 3 plasmid-encoded (1 from *Aeromonas caviae* – ADI55014; 1 from *Vibrio fluvialis* – found under 3 different GenBank entries: AEM62764, AER42862 or AER42863; and QnrC) and an ORF from *Acinetobacter baumannii* (DNA GenBank: GU944730), without information about its chromosomal or plasmid encoding, were detected. This ORF, found within a class 1 integron, shows the transferability of QnrVC-like from water-borne microorganisms towards a relevant nosocomial pathogen.[6] Besides, sequences with internal stop codons were also found, as QnrVC2 (GenBank: AB200915) present in the pVN84 of *V. cholerae*.[1]

The plasmid-encoded QnrVC-like (QnrVC4) present in *A. caviae* have also been recently introduced in GenBank as detected in river-isolated microorganisms such as *Escherichia coli* (JQ837999.1), *A. hydrophyla* (i.e.: JQ838001.1), in both encoded within a class 1 integron, *Pseudomonas* sp. (i.e.: JQ838008.1), or other *Aeromonas* spp. (JQ838004.1). QnrC shows identities >70% with the remaining potential QnrVC sequences, except EAS42881 (*P. profundum*) and YP_002263022 (*A. salmonicida*) (Fig. 1). This phylogenetic nearby between QnrC and members of the QnrVC family, previously noted by Wang et al.,[10] suggests the *Vibrionaceae* genus as the ancestral chromosomal source of QnrC.



GenBank access[1]	Qnr nomenclature[2]	Microorganism	Location		Identity matrix 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
EGQ95960		*V. cholerae*	Chromosome	1		99	99	82	79	80	81	72	71	75	75	63	66
ADI55014	QnrVC4	*A. caviae*	Plasmid	2			99	82	80	81	81	72	72	76	76	64	65
AEM62764		*V. fluvialis*	Plasmid	3				83	80	81	82	72	72	76	76	64	66
EGU51872		*V. orientalis*	Chromosome	4					78	80	80	72	72	73	72	59	65
ADI81040	QnrVC3	*V. cholerae*	Chromosome	5						98	98	72	69	72	71	63	61
ORF[3]		*A. baumannii*	N.I.	6							99	73	70	72	71	65	62
ACC54440	QnrVC1/VC3[4]	*V. cholerae*	Chromosome	7								74	70	72	72	65	62
ACK75961	**QnrC**	***P. mirabilis***	**Plasmid**	8									**67**	**70**	**68**	**60**	**64**
YP_002263022		*A. salmonicida*	Chromosome	9										78	77	65	65
YP132629		*P. profundum*	Chromosome	10											97	62	66
EAS42881		*P. profundum*	Chromosome	11												62	66
BAD88776	QnrS1		Plasmid	12													60
AAL60061	QnrA1		Plasmid	13													

Fig. 1. Phylogenetic relationships among *qnrVC*-like genes. The distance-based tree was generated by using p distance with the neighbour-joining method. 1: only one GenBank access is indicated for each different Qnr sequence included in the figure, as indicated in the text, QnrVC4 has also been described in other microorganisms. 2: specific nomenclature present in the literature. When the sequence has been published or introduced in Genbank as an erroneous member of an established Qnr family has not been considered. 3: located within the GenBank DNA sequence No. GU944730. 4: introduced in GenBank as QnrVC1 in 2008,[1] but a posterior correction in the sequence results in a sequence 100% identical to GenBank sequences ADI81036 and ADI81043 introduced as QnrVC3.[3] In the absence of an established nomenclature we refer to this sequence as QnrVC1/VC3. 5: YP_002263022 (*A. salmonicida*) has been claimed as a representative of a novel Qnr-family, however it is not plasmid encoded and many other QnrVC-like were previously described, then we considered that will be more correct considered as a potential member of the QnrVC family. N.I.: non-information about its genetic location is disposable. In the identity matrix, QnrC has been noted in bold, and identities of QnrC with remaining sequences have been highlighted.

0213-005X/$ – see front matter © 2012 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

A serious confusion statement was observed among GenBank entries. Thus, 5 entries, in which a QnrVC-like was found, were recorded as QnrB1, other 2 as QnrC (both different that currently described QnrC), and two different sequences as QnrVC3. Similarly, the ORF present in sequence GU944730, it is not reported in GenBank as encoding a QnrVC-like gene, but it has been introduced in INTEGRALL (http://integrall.bio.ua.pt/), an internet repository devoted to integrons, as encoding a QnrVC1b protein, and recently published as QnrVC-like.[6]

Finally, the Qnr loops A and B, essential for the activity of different Qnr proteins,[9] were predicted in all QnrVC-related proteins. Thus, QnrVC-like may be considered as full functional Qnr-like proteins.

In conclusion, a series of sequences that may be including within a new common transferable Qnr-family have been found in GenBank. The close similarity (higher than 70%) between the QnrC and QnrVC families may suggest the need for nomenclature unification following the current established normative.

Acknowledgment

Joaquim Ruiz has a fellowship from the Programa I3 from Ministerio de Economía y Competitividad, Spain.

References

1. Fonseca EL, dos Santos Freitas F, Vieira VV, Vicente ACP. New *qnr* gene cassettes associated with superintegron repeats in *Vibrio cholerae* 01. Emerg Infect Dis. 2008;14:1129–31.
2. Kim HB, Wang M, Ahmed S, Park CH, LaRocque RC, Faruque ASG, et al. Transferable quinolone resistance in *Vibrio cholerae*. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:799–803.
3. Kumar P, Thomas S. Presence of *qnrVC3* gene cassette in SXT and class 1 integrons of *Vibrio cholerae*. Int J Antimicrob Agents. 2011;37:280–1.
4. Rajpara N, Patel A, Tiwari N, Bahuguna J, Antony A, Choudhury, et al. Mechanism of drug resistance in a clinical isolate of *Vibrio fluvialis*: involvement of multiple plasmids and integrons. Int J Antimicrob Agents. 2009;34:220–5.
5. Singh R, Rajpara N, Tak J, Patel A, Mohanty P, Vinothkumar K, et al. Clinical isolates of *Vibrio fluvialis* from Kolkata, India, obtained during 2006: plasmids, qnr and mutation in gyrase A as mechanisms of multidrug resistance. J Med Microbiol. 2012;61:369–74.
6. Wu K, Wang F, Sun J, Wang Q, Chen Q, Yu S, et al. Class 1 integron gene cassettes in multidrug-resistant Gram-negative bacteria in southern China. Int J Antimicrob Agents. 2012;40:264–7.
7. Xia R, Guo X, Zhang Y, Xu H. *qnrVC*-like gene located in a novel complex class 1 integron harboring the IS*CR1* element in an *Aeromonas punctata* strain from an aquatic environment in Shandong province, China. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:3471–4.
8. Jacoby G, Cattoir V, Hooper D, Martínez-Martínez L, Nordmann P, Pascual A, et al. *qnr* gene nomenclature. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:2297–9.
9. Ruiz J, Pons MJ, Gomes C. Transferable mechanisms of quinolone-resistance. Int J Antimicrob Agents. 2012;40:196–203.
10. Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S, et al. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of Proteus mirabilis. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:1892–7.

Maria J. Pons, Cláudia Gomes, Joaquim Ruiz *

Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Spain

* Corresponding author.
E-mail address: joruiz@clinic.ub.es (J. Ruiz).

http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2012.09.008

AAC(6')-Ib-cr

És un mecanisme de resistència transferible que actua mitjançant l'inactivació enzimàtica de certes quinolones, concretament la ciprofloxacina i norfloxacina. El gen *aac(6')-Ib* codifica un aminoglicòsid acetiltransferasa responsable de la resistència a aminoglicòsids. Concretament la variant *cr* del gen, es caracteritza per 2 canvis aminoacídics: Trp-102-Arg i Asp-179-Tyr respecte a *aac(6')-Ib* (GenBank AAD22142.2), codifica per un aminoglicòsid acetiltransferasa que confereix sensibilitat reduïda a la ciprofloxacina i la norfloxacina mitjançant la N-acetilació d'un grup piperazinil amina. [102] [103]

S'han descrit fins a 4 variants més d'aquest gen, la última AAC(6')-Ib-cr4, presenta els canvis Trp-128-Arg i Asp-205-Tyr, anàlegs a Trp-102-Arg i Asp-179-Tyr de AAC(6')-Ib-cr. [104] Adicionalment també conté el canvi Asn-46-Thr, ja descrit prèviament en altres variants, i la seva activitat davant les fluoroquinolones ha estat demostrada. [105]

Aquest mecanisme genera baixa resistència, sovint actua de manera conjunta amb Qnr per generar resistències. [104] De fet és conjuntament amb *qnrB*, dels TMQR que es troben de manera més freqüent en l'actualitat. [100]

Qep

El gen *qepA* codifica per una bomba d'expulsió activa de la família MFS. QepA és responsable de la resistència a algunes quinolones (per exemple ciprofloxacina). [106] Aquest mecanisme juga un rol variable segons la hidrofobicitat de la quinolona, així presenta màxima activitat en antibiòtics hidrofílics com la ciprofloxacina o la norfloxacina, i una activitat quasi menyspreable a les quinolones de caràcter hidrofòbic com és l'àc. nalidixic. [101] Actualment es coneixen 2 al·lels, que difereixen només en 2 aminoàcids. [101, 103]

OqxAB

És també un gen que codifica per una bomba d'expulsió plasmídica, de la mateixa manera que *qepA,* pertanyent a la família RND. Aquests gens són els responsables de petits augments en les concentracions mínimes inhibitòries (CMI) a quinolones. Aquests canvis són suficients per facilitar la selecció de mutants amb nivells de resistència més elevats. Aquest gen va ser trobat en un plasmidi d'*E. coli* d'origen porcí l'any 2004. [107, 108] Aquestes bombes tenen la capacitat, no tan sols de ser efectives davant de quinolones, sinó a un ampli ventall de substàncies com són desinfectants, antisèptics, detergents.... [108].

OqxAB ja ha estat descrit en moltes espècies d'interès cínic, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca* i sobretot en *Klebsiella pneumoniae*. Cal destacar que en *K. pneumoniae*, el gen *oqxAB* es troba codificat en el cromosoma. [109, 110]

En estudis anteriors s'havia atribuït la presència d'*oqxAB* a nivells baixos de resistència a àc. nalidixic, fumequina, ciprofloxacina i norfloxacina. (Hansen, Jensen et al. 2007). No obstant s'ha observat que la presència del gen *oqxA* i *oqxB*, no correlaciona amb canvis en la CMI a ciprofloxacina, atribuint l'efecte no sols a la presència del gen, sinó

als seus nivells diferents d'expressió. [107] La contribució d'aquests gens, *oqxA* i *oqxB*, en l'aparició de resistències a quinolones s'ha començant a investigar activament en els darrers anys. [100]

Seguidament es mostra una revisió publicada a la revista: International Journal of Antimicrobial Agents, que es titula " Transferable mechaisms of quinolone resistance", on s'amplia els mecanismes implicats en la resistència a quinolones, de caire transferible.

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/ijantimicag

Review

Transferable mechanisms of quinolone resistance

Joaquim Ruiz[a,b,*], Maria J. Pons[a], Cláudia Gomes[a]

[a] Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona (CRESIB), Hospital Clinic, Universitat de Barcelona, C/Rosselló 149-153, Barcelona, Spain
[b] CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Quinolone resistance
Qnr
Qep
OqxAB
AAC(6′)-Ib-cr
Natural transformation

ABSTRACT

Quinolones were introduced into clinical practice in the late 1960s. Although quinolone resistance was described early, no transferable mechanism of quinolone resistance (TMQR) was confirmed until 1998. To date, five different TMQRs have been described in the literature, including target protection (Qnr), quinolone modification (AAC(6′)-Ib-cr), plasmid-encoded efflux systems (e.g. QepA or OqxAB, amongst others), effect on bacterial growth rates and natural transformation. Although TMQRs usually only result in a slight increase in the minimum inhibitory concentrations of quinolones, they possess an additive effect and may facilitate the acquisition of full quinolone resistance. The emergence of new related genes may continue in the next years.

© 2012 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Nalidixic acid (NAL) was the first quinolone-derived agent demonstrating antibacterial activity as well as useful clinical parameters [1], being followed in the 1970s by novel compounds of this family such as pipemidic acid, although the clinical indication for these quinolones remained limited to urinary tract infections. The posterior addition of a fluorine atom at position 6 of the quinolone molecule greatly enhanced its activity. Since then, a large series of molecules of this family has been synthesised and several have been introduced into clinical practice, with ciprofloxacin (CIP) being the most representative [2]. However, some quinolones have been withdrawn from clinical practice following restriction of their use owing to secondary effects, including some deaths [3–5].

Fluoroquinolones (FQs) have been extensively used to treat a great variety of bacterial infections [6–9]. Moreover, some FQs possess activity against eukaryotic targets and have been studied as a possible novel antiparasitic treatment [10,11] or explored as potential antineoplastic agents [12]. Finally, quinolones have been extensively used in veterinary practice [13,14]. However, the World Health Organization (WHO) currently considers FQs to be critically important antimicrobials, proposing very restricted use in veterinary practice [15], and a number of countries such as those of the European Union have forbidden some related uses (i.e. use as growth promoters).

This high level of use results in the selection and spread of quinolone-resistant microorganisms [13,16,17]. For a long time, the mechanisms of quinolone resistance described were exclusively chromosomal (Table 1), including specific amino acid substitutions in the quinolone targets (DNA gyrase and topoisomerase IV), decreased quinolone uptake into bacteria owing to either alterations in the outer membrane protein composition or to overexpression of efflux pumps, and alterations in the expression levels of the quinolone targets [18,19]. None the less, the absence of transferable mechanisms of quinolone resistance (TMQRs) has long been of note and considered to be unlikely as quinolones are fully synthetic drugs [20].

2. The history of transferable mechanisms of quinolone resistance

Although the first definitively established TMQR was described in 1998 [21], various articles published prior to this year presented similar results [22–24]. However, these results were not confirmed, or further studies showed possible data misinterpretation.

In 1985, conjugation of NAL resistance was reported with a frequency of 10^{-6}–10^{-7}, but the transfer of a plasmid was not established and ethidium bromide was unable to revert the resistance in the transconjugants [24]. Then a mechanism of resistance to NAL carried on a transposon was proposed. The presence of mutations in the quinolones targets was not analysed and no further data have been found in the literature.

Acquisition of NAL resistance in an *Escherichia coli* K12 recipient together with the transfer of a plasmid of 20 MDa was described during a *Shigella dysenteriae* type 1 outbreak in Bangladesh [23]. Selection of the transconjugants was performed in minimal medium, which minimises the bactericidal effect of quinolones

* Corresponding author. Present address: Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona (CRESIB), Hospital Clínic, Edifici CEK, Planta 1, C/Rosselló 149-153, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932 275 400x4547; fax: +34 932 279 853.
E-mail address: joruiz@clinic.ub.es (J. Ruiz).

0924-8579/$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.02.011

Table 1
Chromosomally encoded mechanisms of quinolone resistance.

Target alterations
Efflux pumps
Outer membrane alterations
Lower target expression levels
Target protection[a]

[a] Chromosomally encoded Qnr-like proteins.

against *E. coli* and probably favours the development of quinolone resistance in *E. coli* [25], and no analysis was undertaken of the possible selection of spontaneous NAL-resistant recipient *E. coli* mutants by the development of mutations in the quinolone targets or decreased intracellular uptake. After re-inspection of the data, the presence of spontaneous NAL-resistant mutants of the recipient *E. coli* rather than authentic transconjugants was confirmed [20].

Currently described TMQRs (Table 2), usually encoded within plasmids but also related to chromosomal structures [26], only produce a low level of resistance to quinolones, usually below the considered resistance breakpoints. However, concomitant presence of two or more of these mechanisms in the same microorganism should be taken into account because of their additive action, with an increase in the minimum inhibitory concentrations (MICs) to quinolones [27–29]. Similarly, different basal levels of expression of some of these mechanisms have been described, such as QnrA or QepA determinants, which may result in different levels of resistance to quinolones [28,30]. However, on cloning the EfsQnr (Qnr-like protein from *Enterococcus faecalis*) into *E. coli* it was observed that its overexpression strongly affects the viability of host bacteria [31]. Although a specific toxic effect of EfsQnr on the *E. coli* recipient cannot be excluded, this observation suggests a possible inverse relationship between the Qnr protection level against quinolone action and noxious effects on bacterial viability.

The main relevance of decreased susceptibility to FQs lies in the fact that the microorganisms may develop full resistance to those antimicrobials more easily [21,27,32], and treatment with quinolones in this setting may result in therapeutic failure [33]. However, a recent report has shown that the presence of Qnr determinants may result in a lower selection of mutations in the genes encoding the quinolone targets but in higher values of the mutant prevention concentration (MPC) of FQs [34].

The presence of TMQRs in the absence of target mutations may result in microorganisms presenting resistance to NAL and FQs [35] or in isolates exhibiting susceptibility to NAL but intermediate or full resistance to FQs [36,37]. Interestingly, in *Stenotrophomonas maltophilia* the NAL-susceptible, FQ-resistant phenotype, is usual [38]. Although a relevant role of efflux pumps cannot be ruled out [39,40], this microorganism presents a chromosomally encoded Qnr-like protein [41].

Although extensively sought in *Enterobacteriaceae*, TMQRs have also been described in microorganisms belonging to other genera, such as *Aeromonas* spp., *Haemophilus parasuis*, *Pseudomonas* spp. or *Staphylococcus aureus* [42–46].

Retrospective studies have shown that the oldest isolates in which a *qnr*-like gene has been detected were collected in 1988 (one *Citrobacter freundii* and one *Klebsiella pneumoniae* from the USA and Argentina, respectively), whilst the *aac(6′)-Ib-cr* gene was detected in an isolate of *E. coli* recovered in 1998 in Israel [47,48]. Future studies will probably detect that older isolates carried these or other TMQRs.

3. Transferable mechanisms of quinolone resistance

3.1. Quinolone target protection

During a study aimed at establishing the presence of extended-spectrum β-lactamases encoded on conjugative plasmids in *Enterobacteriaceae*, the transfer of a quinolone resistance determinant able to confer low-level resistance to some quinolones was detected [21]. This study also showed that strains carrying the aforementioned plasmid acquired quinolone resistance more easily [21].

Further studies identified the gene encoding the protein responsible for this phenomenon [49]. This gene was named *qnr* (for quinolone resistance) and is currently known as *qnrA1* [50]. Similar to other Qnr-encoding genes (not *qnrS* type), the *qnrA1* gene is located within a complex class 1 integron environment upstream from the first *qacEΔ1–sul1* [49,51].

Although a low prevalence of Qnr determinants was shown in early studies [52], further studies have shown that the *qnr* genes are distributed worldwide, being present in different microorganisms (mainly Enterobacteriaceae) and with a prevalence that varies from area to area [39,53–55].

Table 2
Currently described transferable mechanisms of quinolone resistance (TMQRs).

Plasmid encoded			
Generic mechanism	Specific mechanism	Alleles/genes[a,b]	Year of description
Quinolone target protection	QnrA	7	1998
	QnrS	6	2005
	QnrB	48	2006
	QnrC	1	2009
	QnrD	1	2009
	QnrVC	10	2008
Enzymatic inactivation	AAC(6′)-Ib-cr[c]	1	2006
Slow growth	pKM101		1996
Efflux pumps	QepA-like	2	2007
	OqxAB	1	2003
	QacBIII	1	2010
	Others	1	2004
Exogenous exchange of DNA			
Natural transformation	GyrA/ParC		

[a] One QnrS (GenBank accession no. AEG47318) and one QnrB (GenBank accession no. ABO93588) allele, although fully sequenced in the GenBank database, were not present in http://www.lahey.org/qnrStudies (last accessed 9 January 2011). Similarly, no QnrVC is present in the aforementioned internet repository; GenBank accession nos. for possible members of this Qnr family are presented in Fig. 1.
[b] Not all of these Qnr-like proteins have been described in plasmids.
[c] The presence of two subvariants has been proposed [*aac(6′)-Ib-crA* and *aac(6′)-Ib-crC*], defined on the basis of a mute change in the amino acid codon encoding R102 (AGG or CGG) [26].

The Qnr proteins are pentapeptide-repeat proteins (PRPs) characterised by a tandem five amino acid repeat with the recurrent motif [Ser, Thr, Ala or Val] [Asp or Asn] [Leu or Phe] [Ser, Thr or Arg] [Gly] [56]. Although their original function remains unknown, one possibility is their involvement in protection against natural DNA gyrase inhibitors such as microcin B17 [57], like other members of the PRP family such as McbG or MfpA proteins [58,59] or other unrelated proteins such as GyrI [60,61].

The Qnr proteins interact with DNA gyrase and topoisomerase IV, hindering the action of the quinolones and minimising their inhibitory effect as has been shown by different in vitro studies [49,62]. Crystallography studies have shown that Qnr proteins are dimers and that, in general, each one folds into a right-handed β-helix (like other PRPs) with nine complete coils [31,63,64]. In plasmid-encoded and some chromosomally encoded Qnr proteins, two non-canonical PRP sequences interrupt the threading of pentapeptides into the β-helical fold, producing outward projecting loops (loop A and loop B) that interrupt the regularity of the PRP surface [63,64]. In QnrB1, deletion of loop B results in the lack of a protective effect, whereas deletion of loop A drastically reduces the protective effect [63]. Similar results have been shown in AhQnr (chromosomal Qnr-like protein from *Aeromonas hydrophila*) [64].

Xiong et al. [64] proposed that AhQnr might locate in the gyrase structure interacting by electrostatic charges, whilst loop A interacts with the GyrA 'tower' and loop B with GyrB (TOPRIM domain). Thus, Qnr proteins acting as a DNA mimic might reduce the amount of the holoenzyme–DNA complex, minimising the possibility of the quinolones cleaving this structure and producing DNA breakage [65]. A similar mechanism of action has been proposed for other Qnr-like proteins such as MfpA in *Mycobacterium tuberculosis* [66], in accordance with the 'poison' theory that proposes stable barriers to the replication or transcription processes associated with the action of quinolones on the complex holoenzyme–DNA, which would be directly responsible for the killing activity of quinolones [67]. Alternatively, it has been proposed that Qnr proteins act by binding to and destabilising the complex topoisomerase–quinolone–DNA, favouring the regeneration of a catalytically active form of the topoisomerase [63].

Five families of Qnr proteins have been established according to their DNA homology, each one comprising one or more alleles (sequence possessing at least one difference at the amino acid level): QnrA (7 alleles); QnrB (48 alleles); QnrS (6 alleles); QnrC (1 allele); and QnrD (1 allele) (Table 2; Fig. 1) [50,53,69–72]. In addition, the QnrVC family (10 alleles) has recently been described [46,73,74]. QnrVC alleles are transferable [74] and some of them have been reported to be encoded within an integron environment, such as QnrVC4 (protein GenBank accession no. ADI55014) or an unnamed ORF (DNA GenBank accession no. GU944730). Thus, QnrVC4 has been described within a complex class 1 integron located in a large non-conjugative plasmid in *Aeromonas caviae* [46], whilst the unnamed ORF was described within an integron environment in *Acinetobacter baumannii*. Moreover, different Qnr-like proteins have been identified as part of the chromosome of different Gram-positive or Gram-negative microorganisms [50,75–77].

Exponential growth of the Qnr-related genes described has led to a proposal to bring order to the current nomenclature of these genes (for more information see [50]). In addition, a repository electronic database (http://www.lahey.org/qnrStudies) has been proposed to maintain order in the nomenclature of the currently described and future newly detected Qnr determinants. Despite this proposal, a high number of complete or partial *qnr* genes are present in GenBank with a very confused and non-standard nomenclature.

As mentioned previously, some proteins showing homology with Qnr proteins, able to confer low levels of quinolone resistance

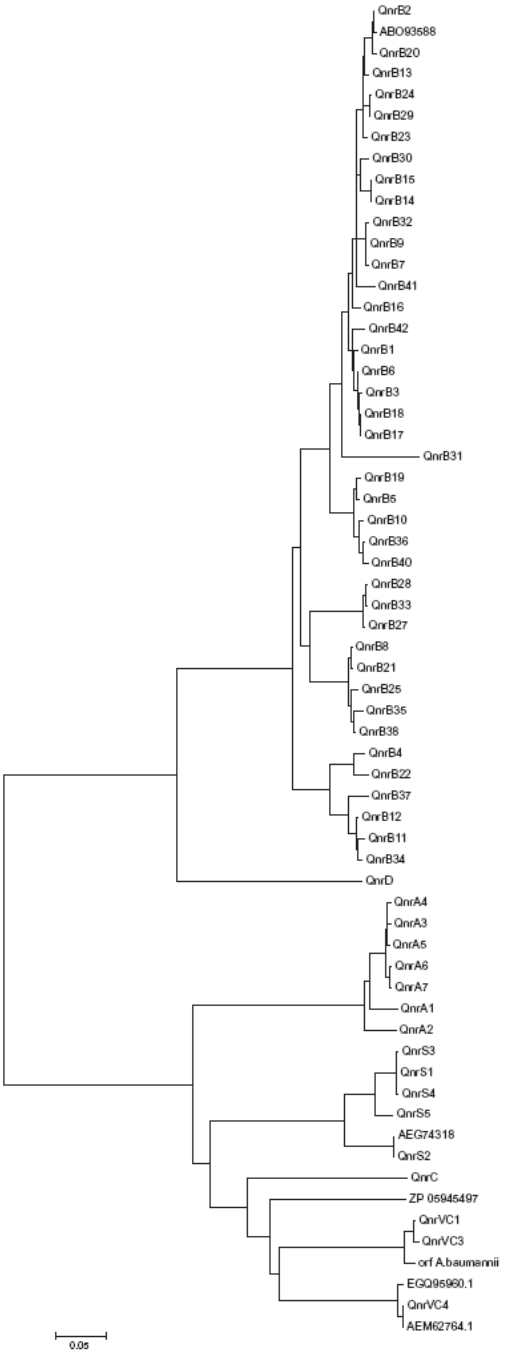


Fig. 1. Phylogenetic relationship amongst the *qnr* genes. Six *qnr* gene families have been included in the phylogenetic tree, including *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD* and *qnrVC*. The selected sequences for *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* and *qnrD* are those present on the webpage http://www.lahey.org/qnrStudies in which a GenBank accession no. is indicated. In addition, the protein sequences ABO93588 (QnrB-like) and AEG47318 (QnrS-like), both present in GenBank fulfilling the criteria defined by Jacoby et al. [50], have been added. In addition, seven protein sequences present in GenBank have been selected related to *qnrVC1* following the aforementioned criteria. The distance-based tree was generated using p-distance with the neighbour-joining method with MEGA version [68].

when cloned in *E. coli* or other bacteria, have been identified within the chromophore of either Gram-positive or Gram-negative microorganisms [76–80], the latter mainly associated with aquatic environments. In addition, *qnr*-like genes have been detected during the course of metagenomic studies [81].

It has been proposed that some Qnr family proteins derived from chromosomal ancestors present in waterborne Gram-negative microorganisms such as *Shewanellaceae* or *Vibrionaceae* [76–79]. In fact, four chromosomally encoded proteins of *Shewanella algae* and one of *Shewanella putrefaciens* present >70% homology with members of the QnrA family [50,77], thereby being considered as QnrA family members (QnrA2, *S. putrefaciens*; and QnrA3, QnrA4, QnrA5 and QnrA7, *S. algae*). To date, QnrA2 and QnrA3 have also been detected within plasmids in other microorganisms such as *Klebsiella oxytoca* or *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates [82]. QnrC presents an amino acid similarity with VcQnr1 (QnrVC1) of >70%, which might allow these Qnr proteins to be classified within a common family as different alleles of the same gene [50], suggesting their possible origin from an ancestor of the *Vibrionaceae* family [72]. Finally, *Vibrio splendidus* has been proposed as one of the origins of the QnrS-like proteins [78].

QnrB-related proteins have also been detected in seawater metagenome analysis, and chromosomally encoded in *S. maltophilia* as well as in some Enterobacteriaceae such as *Serratia proteamaculans*, *Serratia marcescens* or *Citrobacter* spp. [41,81,83,84], this latter genus being proposed as the original source of QnrB proteins [84]. The high similarity between QnrD and QnrB-related proteins suggests that the aforementioned chromosomally encoded QnrB-related proteins might also possess a close phylogenetic relationship with QnrD. Finally, at present no Gram-positive plasmid-derived *qnr* gene family has been described.

A high intraspecies variability has been detected amongst SmQnr of *S. maltophilia* [41,85–87]. At least 47 different alleles are currently present in GenBank, and an Internet repository (http://www.icms.qmul.ac.uk/centres/immunologyandinfectiousdisease/Smqnr%20Web%20v2.htm) has been proposed to bring order to the specific nomenclature of these alleles [87].

On studying the VPQnr, a chromosomally encoded Qnr-like protein of *Vibrio parahaemolyticus* (formerly VPA0095), Saga et al. [79] showed that a single substitution (C115 → Y) was able to produce a significant increase in quinolone resistance levels when cloned and expressed in *E. coli*. Similar results have been published regarding different MIC levels of quinolones that appear to be associated with the presence of allelic variants of the SmQnr [86]. Following this evidence, some authors have analysed the effect of point mutations in members of the QnrA, QnrB, QnrC and QnrS families [88–90], showing the presence of specific amino acid substitutions or deletions resulting in partial or full loss of activity of the Qnr proteins (Table 3). Although most of these alterations are not located within loop A or loop B, this loss of activity of Qnr proteins has been associated with alterations in hydrophobicity and protein conformation [89]. On the other hand, it was observed that the QnrS1 substitution D185 → Y conferred slightly higher levels of resistance than parental proteins [i.e. four-fold for CIP, moxifloxacin (MOX) and levofloxacin (LVX)], demonstrating the potential risk of possible future in vivo selection of more active Qnr proteins. However, the aforementioned possible inverse relationship between protection level and viability should be taken into account as a possible limitation to this selection [31].

Qnr determinants have been related to an enhanced facility to develop full resistance to quinolones [21,29], in agreement with the fact that decreased resistance levels to FQs favour the acquisition of full resistance to these agents [32]. However, it has been reported that despite this enhanced facility to develop higher levels of quinolone resistance, *E. coli* isolates harbouring a *qnr* determinant present a low selection of topoisomerase mutations [34]. The authors suggest that this phenomenon might be related to both the action of the Qnr proteins, making it difficult for quinolones to interact with their specific targets, and the presence of other mechanisms of resistance that might be selected in *qnr*-carrying isolates. It should be taken into account that in the aforementioned study, the antibiotic concentration present in the selective plates used to obtain the mutants was established according to the MIC of the microorganisms, thereby being significantly higher (>10-fold) in the plates in which isolates carrying *qnr* genes were analysed [34]. In fact, the same authors noted that the MPC of the selected FQ was even higher in strains carrying a *qnr* gene (range of MPC of CIP, 2–4 mg/L; range of MPC of MOX, 2–8 mg/L) than in those not carrying the gene (MPC of CIP, 0.12 mg/L; MPC of MOX, 0.5 mg/L). These MPC values of the strains carrying a *qnr* gene were higher than the antibiotic concentrations that might be reached in serum following a therapeutic dose [91], showing the relevance of these genes in clinical practice.

Table 3
Single amino acid substitutions negatively affecting the activity of Qnr proteins.

Position[a]	Wt	Qnr activity[b]			
		QnrA1	QnrB1	QnrC1	QnrS1
13	F	S			
38[c]	L	P		R	
56	G	Δ, D	Δ, E		Δ, D
72	C	Y	Y	Y	Y
92[c]	C	Y	Y		Y
96	G	D	D		D
97	A			Y	
114	F	D	D		
115[c]	C		Y		
116	S		D	P	
117	A		C, V		C, V
153	S			P	
159	L	D	D		D
185[d]	D		Y		
188	D	V			

[a] Numbering refers to QnrA1, QnrC1 and QnrS1 positions. QnrB1 transcription starts three amino acids later, thus it is necessary to subtract three from all positions stated in the first column (i.e. G56 in QnrA corresponds to G53 in QnrB1).
[b] Only considering those substitutions affecting more than 4-fold the activity of the Qnr proteins.
[c] Other alterations described in the same position do not result in loss or gain of activity (i.e. QnrA1, L38F, C92S, C115S; QnrC1, L38A).
[d] The same amino acid substitution in QnrS1 results in enhanced activity.

3.2. Enzymatic inactivation

Enzymatic inactivation of quinolones, although observed in some fungi several years ago [92], was not an established phenomenon in bacteria until 2006. Thus, although first detected in 2003 during a study of TMQR in *E. coli* [55], it was not until 2006 that it was definitively established that an aminoglycoside-modifying enzyme, a variant of AAC(6′)-Ib named AAC(6′)-Ib-cr, conferred low-level resistance to some quinolones such as CIP and norfloxacin (NOR), retaining its ability to inactivate aminoglycosides [27]. This AAC(6′)-Ib variant presented two amino acid substitutions (W102 → R and D179 → Y) related to the ability to inactivate the aforementioned quinolones by means of an *N*-acetylation of its piperazinyl amine [27]. No effect of AAC(6′)-Ib-cr has been observed on quinolones with an unsubstituted piperazinyl group.

The interaction between AAC(6′)-Ib-cr and its substrates differs according to whether they are aminoglycosides or FQs [93]. When this enzyme acts on aminoglycosides, the interactions between AAC(6′)-Ib-cr and these antimicrobial agents are made by numerous hydrogen-bonding interactions. However, when acting on quinolones, the interactions appear to be related to several stacking interactions. A difference has been established in the optimum pH

Table 4
Characteristics of plasmid-encoded efflux pumps.

Efflux pump	Species[a]	Quinolones		Inhibitable	*rmtB*[d]	Inc[e]	Year[f]	Ref.
		Substrates[b]	Non-substrates[c]					
OqxAB	*Escherichia coli*	NAL, FMQ, CIP, NOR	N/I	N/I	Yes	IncX1	2003	[106,107]
QepA1	*E. coli*	CIP, NOR	NAL, MOX, LVX, PFLX, SPFX, GFLX	CCCP, NMR, PAβN	Yes	IncFI	2007	[102,104]
QepA2	*E. coli*	CIP, NOR	NAL, OFX, MOX, LVX, PFLX, GFLX	N/I[g]	No	IncFI	2008	[100]
pRSB101[h]	N/I	NAL, NOR	N/I	N/I	No	N/I	2004	[103]
QacBIII	*Staphylococcus aureus*	NOR, CIP	LVX	N/I	N/I	N/I	2010	[44]

NAL, nalidixic acid; FMQ, flumequine; CIP, ciprofloxacin; NOR, norfloxacin; MOX, moxifloxacin; LVX, levofloxacin; PFLX, pefloxacin; SPFX, sparfloxacin; GFLX, gatifloxacin; OFX, ofloxacin; N/I, no information; CCCP, carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone; NMR, 1-(1-naphtylmethyl)-piperazine; PAβN, Phe-Arg-β-naphthylamide.
[a] Species in which the efflux pump has been detected.
[b] Quinolones in which this information is available and in which the described effect is >2-fold.
[c] Quinolones in which this information is available and in which the described effect is ≤2-fold.
[d] Presence of the *rmtB* gene within the same plasmid.
[e] Incompatibility group of the plasmid in which the efflux pump gene has been described.
[f] First description.
[g] Although no information is available, it is predicted that it will act similar to QepA1.
[h] Efflux pump located within pRSB101 plasmid that has not yet received a formal name.

levels for the activity of AAC(6′)-Ib-cr according to its substrates. Thus, the optimum pH for the activity of AAC(6′)-Ib-cr when it acts on aminoglycosides is 6.1, whereas it is 7.7 when acting on FQs [93].

Analysis of the two amino acid substitutions by themselves showed that the single presence of the D179→Y substitution appears to confer a slight increase in CIP resistance level (less than that present in isolates presenting both substitutions) [27]. The main role of the substitution at position 179 has been confirmed by mechanistic studies [93]. Thus, Y179 would be involved in an increase in the affinity of AAC(6′)-Ib-cr for FQs, interacting with them, whilst R102 plays a role as a stabiliser of the interactions. Another proposed interaction model has also suggested a direct role in the interactions between Y179 and FQs, whilst involving the R102 in an interaction with the fluoroquinolone carboxylate [94].

AAC(6′)-Ib-cr has been described worldwide, either plasmid or chromosomally encoded [26,37,48,95], including farm animal [28] and environmental microorganisms [96], showing its great potential to be disseminated. Moreover, it is possible that further adaptations of this or other enzymes able to modify antibacterial agents would be more efficient as a mechanism of quinolone resistance.

3.3. Slow growth

In some microorganisms such as *E. coli*, slow growth has been related to alterations in quinolone activity [25]. Although the most frequent reports of this phenomenon have been observed when the microorganisms are grown in minimal medium or in the presence of specific mutations in the promoter region of the topoisomerase IV-encoding genes [19,25], some plasmids affecting the duplication rates may affect microorganism susceptibility levels.

In 1996, it was described that the presence of the plasmid pKM101, belonging to the IncN incompatibility group and used in the Ames test [97], results in higher survival rates of *E. coli* grown in minimal medium in the presence of CIP [22]. The authors disregarded the possible role of the *mucAB* genes, involved in the error-prone repair of DNA, as being responsible for these enhanced survival rates and the presence of a slow-growth phenotype.

This slow-growth phenotype was associated with a 2.2 kb region of the plasmid containing the *korB*, *traL*, *korA* and *traM* genes and was suppressed (as were higher survival rates) in minimal medium in the presence of adenine and hypoxanthine. Curiously, in starvation conditions, *E. coli* strains carrying the pKM101 plasmid showed lower rates of survival in the presence of CIP.

The authors hypothesised about the role of the region between the *korB* and *korA* genes, but the exact mechanism of action remains unknown. Although this slow-growth phenotype (resulting in small-colony formation) has been described by other authors [98], no other report has been found in the literature to provide more accurate information.

3.4. Plasmid-encoded efflux pumps

Efflux pumps are a well-established quinolone resistance mechanism [18]. Different families of efflux pumps are able to pump out quinolones possessing different affinities, affecting in a different manner the corresponding final MIC levels and thus having different clinical relevance [99]. Although usually encoded in the bacterial chromophore, a few different plasmid-encoded efflux pumps able to pump out quinolones have been described (Tables 2 and 4) [100–104]. Interestingly, most of the plasmids carrying these efflux pumps have a close relationship with the farm world, suggesting that present or past use of antimicrobial agents in veterinary practice may not be excluded as a possible selection factor, and the association between these efflux pumps and the presence of the *rmtB* gene, encoding an unusual mechanism of resistance (target methylation) to aminoglycosides, is frequent [28,105].

OqxAB is a member of the resistance–nodulation–cell division (RND) family of multidrug efflux pumps [101], encoded on pOLA52, a plasmid belonging to the IncX1 incompatibility group, possessing a high similarity (99%) with a putative chromosomally encoded efflux pump system of *K. pneumoniae* (GenBank accession nos. ABR_76475 and ABR_76476). Although first described in farm animals as involved in the development of resistance to olaquindox, a quinoxaline-di-*N*-oxide used as a growth promoter in pigs [106], it has been detected in humans both in pathogenic and commensal microorganisms, with its presence amongst farm workers in China being of note [107,108].

Further studies have shown that OqxAB is able to pump out NAL, flumequine, CIP and NOR, increasing the MICs to these agents 8-, 32-, 32- and 64-fold, respectively [109]. No information on its effect against other quinolones has been reported.

On studying plasmids recovered from a wastewater bacterial community, Szczepanowski et al. [103] described within a plasmid (pRSB101) the presence of a tripartite multidrug efflux pump composed by a transcriptional regulator and a membrane fusion protein belonging to an RND-type efflux system with homology of ca. 40% to a putative efflux system of *Geobacter sulfurreducens* (GenBank accession nos. NP_952005 and NP_952003) and a permease and an ATPase belonging to an ATP-binding cassette (ABC)-type efflux pump also presenting great homology (59% and 45%, respectively) with the same *G. sulfurreducens* system (GenBank accession

nos. N_95002 and N_952001). This system lacks an outer membrane component (downstream from the first gene of the system, only the 3′-end region of an *oprM*-related gene remains). Thus, the authors hypothesised that this system is completed by a heterologous host-encoded outer membrane protein. Although no analysis of the possible presence of quinolone target alterations was performed, when the vector was cloned into *E. coli* the MICs of NAL and CIP were 80 mg/L and 0.5 mg/L, respectively, and when the efflux system was subcloned into a pBluescript-II-KS, the MICs of NAL and CIP rose to 550 mg/L and 1.25 mg/L, respectively.

QepA1 (from quinolone efflux pump) was described in 2007, encoded within a conjugative plasmid present in *E. coli* clinical isolates [102,104]. The *qepA1* gene was carried on an IncF1 plasmid (pIP1206) possessing high homology with pRSB107, a plasmid isolated from a sewage treatment plant together with the aforementioned pRSB101 [110].

The *qepA1* gene encodes a 14-transmembrane segment (14-TMS) proton-dependent efflux pump belonging to the major facilitator superfamily (MFS) [102], inhibitable by the presence of different efflux pump inhibitors, with hydrophilic quinolones such as CIP and NOR as substrates, but with a slight or no effect on more hydrophobic quinolones such as NAL, LVX or MOX, amongst others (Table 4), or different unrelated antimicrobial agents such as erythromycin, chloramphenicol, tetracycline or rifampicin. Thus, when transferred to *E. coli*, an increase from 2-fold (NAL, sparfloxacin, lomefloxacin) to 64-fold (CIP) is produced in the MICs of different quinolones [102,104]. However, as with other TMQRs, by itself its effect on the susceptibility levels of the affected quinolones is below the established resistance breakpoints.

Although on analysing the G + C content (72%) of the *qepA1* gene, the actinomycetes group has been suggested as the original source of this gene, at present the origin of this efflux pump currently remains unknown [102].

QepA2, another QepA-like efflux pump, that has been described in a mobilisable non-conjugative plasmid of 90 kb (pQep) belonging to the IncF1 incompatibility group [100], differs in 2 of the 511 amino acids with respect to QepA1, presenting Gly in position 99 and Ile in position 134. Despite these differences, the spectrum of QepA2 substrates (hydrophilic quinolones) is similar to that of QepA1. The main differences between QepA1 and QepA2 lie in their genetic environment. Thus, whilst the *rmtB* gene is located within the same plasmid as the *qepA1* gene, it remains absent in the plasmid that carries the *qepA2* gene [100]. Another difference is the presence of *qepA2* located between two copies of the IS*CR3C* element, instead of an association with IS*26* elements that has been related to QepA1. It has been proposed that this IS*CR*-like element is involved in the processes of mobilisation of the *qepA2* gene [100].

QepA1 and QepA2 probably act as a factor favouring the development of full resistance to CIP or NOR, increasing the frequency of selection of resistant mutants. However, their lack of effect over other quinolones probably does not affect their specific ability to select resistant mutants.

Although the prevalence of the QepA-like efflux pumps appears to be very low, with different survey studies reporting frequencies ranging from 0.3% to 0.8% [100–112], higher frequencies have been reported in samples from animal origins [28]. None the less, the real relevance and extension of these efflux pumps remains unknown, requiring lengthy studies to obtain valid conclusions.

Plasmid-encoded efflux pumps able to extrude quinolones have also been described in *S. aureus* [44]. Thus, on analysing the variability of the plasmid-encoded efflux pumps QacA and QacB, two 14-TMS proton-dependent efflux pumps belonging to the MFS family [113], amongst meticillin-resistant *S. aureus* (MRSA), it was observed that a specific allele of QacB (QacBIII) was able to pump out CIP and NOR but not LVX. Mutagenesis studies showed that this ability was related to the presence of a specific glutamic acid at position 320. In addition, these results also suggest a possible slight effect of QacA on the MIC of the same quinolones. Further studies to evaluate its effect on other quinolones and to identify other possible alleles of QacA/QacB able to extrude quinolones are needed.

3.5. Natural transformation

Acquisition of quinolone resistance mediated by natural transformation of DNA fragments of *gyrA* or *parC* genes carrying amino acid substitutions in the quinolone resistance-related positions has been described in different species of the genus *Streptococcus*, such as *Streptococcus pneumoniae*, different viridans streptococci, *Streptococcus dysgalactiae* or *Streptococcus pyogenes* [114–116].

In vitro studies have shown that resistance could be transferred either from DNA from viridans streptococci to *S. pneumoniae* or vice versa, as well as amongst *S. dysgalactiae* and *S. pyogenes*. The frequencies of transformation ranged from 10^{-3} to $<10^{-7}$ in correlation with the homologies of their quinolone resistance-determining regions (QRDRs).

The relevance of this mechanism of resistance both lies in the specific frequencies of transformation as well as in the incidence of quinolone resistance amongst donor isolates.

4. Concluding remarks

Currently, TMQRs are extensively described around the world. Although they usually result in only a slight increase in the MICs of quinolones, their effect is additive and their presence may facilitate the development of full quinolone resistance. Furthermore, possible specific substitutions may enhance their activity. The emergence of new related genes may continue in the next years, whilst the possible adaptation of other enzymes, similar to what occurred with AAC(6′)-Ib, is a potential risk.

Acknowledgments

The logistic support of Laura Puyol and Diana Barrios is acknowledged.

Funding: JR has a Miguel Servet Fellowship (Instituto de Salud Carlos III, Spain).

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

[1] Lesher GY, Froelich EJ, Gruett MD, Bailey JH, Brundage RP. 1,8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. J Med Pharm Chem 1962;91:1063–5.

[2] Mitscher LA. Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents. Chem Rev 2005;105:559–92.

[3] Blum MD, Graham DJ, McCloskey CA. Temafloxacin syndrome: review of 95 cases. Clin Infect Dis 1994;18:946–50.

[4] Matthews MR, Caruso DM, Phillips BJ, Csontos LG. Fulminant toxic epidermal necrolysis induced by trovafloxacin. Arch Intern Med 1999;159:2225.

[5] Norrby SR, Lietman PL. Safety and tolerability of fluoroquinolones. Drugs 1993;45(Suppl. 3):59–64.

[6] Acar JF, Goldstein FW. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. Clin Infect Dis 1997;24(Suppl. 1):S67–73.

[7] Alonso D, Muñoz J, Ruiz J, Carmona F, Nadal A, Gascón J. *Salmonella* ovarian abscess following travel diarrhoea episode. Arch Gynecol Obstet 2007;276:551–3.

[8] Davis R, Markham A, Balfour JA. Ciprofloxacin. An updated review of its pharmacology, therapeutic efficacy and tolerability. Drugs 1996;51:1019–74.

[9] Ruiz J, Marco F, Oliveira I, Vila J, Gascón J. Trends in antimicrobial resistance levels among *Campylobacter* spp. causing traveler's diarrhea. APMIS 2007;115:218–24.

[10] Anquetin G, Greiner J, Mahmoudi N, Santillana-Hayat M, Gozalbes R, Farhati K, et al. Design, synthesis and activity against *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium* spp., and *Mycobacterium tuberculosis* of new 6-fluoroquinolones. Eur J Med Chem 2006;41:1478–93.

[11] Romero IC, Saravia NG, Walker J. Selective action of fluoroquinolones against intracellular amastigotes of *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* in vitro. J Parasitol 2005;91:1474–9.
[12] Pommier Y, Leo E, Zhang HL, Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. Chem Biol 2010;17: 421–33.
[13] Endtz HP, Ruijs GJ, van Klingeren B, Jansen WH, van der Reyden T, Mouton RP. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. J Antimicrob Chemother 1991;27:199–208.
[14] Millanao A, Barrientos H, Gomez C, Tomova A, Buschmann A, Dölz H, et al. Injudicious and excessive use of antibiotics: public health and salmon aquaculture in Chile. Rev Med Chil 2009;139:107–18 [in Spanish].
[15] Collignon P, Powers JH, Chiller TM, Aidare-Kane A, Aarestrup FM. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. Clin Infect Dis 2009;49:132–41.
[16] Mensa L, Marco F, Vila J, Gascón J, Ruiz J. Quinolone resistance among *Shigella* spp. isolated from travellers returning from India. Clin Microbiol Infect 2008;14:279–81.
[17] Le Hello S, Hendriksen RS, Doublet B, Fisher I, Nielsen EM, Whichard JM, et al. International spread of an epidemic population of *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 resistant to ciprofloxacin. J Infect Dis 2011;204:675–84.
[18] Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. J Antimicrob Chemother 2003;51:1109–17.
[19] Ince D, Hooper DC. Quinolone resistance due to reduced target enzyme expression. J Bacteriol 2003;185:6883–92.
[20] Courvalin P. Plasmid-mediated 4-quinolone resistance: a real or apparent absence? Antimicrob Agents Chemother 1990;34:681–4.
[21] Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet 1998;351:797–9.
[22] Clerch B, Rivera E, Llagostera M. Identification of a pKM101 region which confers a slow growth rate and interferes with susceptibility to quinolone in *Escherichia coli* AB1157. J Bacteriol 1996;178:5568–72.
[23] Munshi MH, Sack DA, Haider K, Ahmed ZU, Rahaman MM, Morshed MG. Plasmid-mediated resistance to nalidixic acid in *Shigella dysenteriae* type 1. Lancet 1987;2:419–21.
[24] Panhotra BR, Desai B, Sharma PL. Nalidixic-acid-resistant *Shigella dysenteriae* I. Lancet 1985;1:763.
[25] Dalhoff A, Matutat S, Ullmann U. Effect of quinolones against slowly growing bacteria. Chemotherapy 1995;41:92–9.
[26] Ruiz E, Sáenz Y, Zarazaga M, Rocha-Gracia R, Martínez-Martínez L, Arlet G, et al. *qnr*, *aac(6′)-Ib-cr* and *qepA* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. J Antimicrob Chemother 2012;67:886–97.
[27] Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nat Med 2006;12:83–8.
[28] Liu JH, Deng YT, Zeng ZL, Gao JH, Chen L, Arakawa Y, et al. Coprevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QepA, Qnr, and AAC(6′)-Ib-cr among 16S rRNA methylase RmtB-producing *Escherichia coli* isolates from pigs. Antimicrob Agents Chemother 2008;52: 2992–3.
[29] Briales A, Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Díaz de Alba P, Domínguez-Herrera J, Pachón J, et al. In vitro effect of *qnrA1*, *qnrB1*, and *qnrS1* genes on fluoroquinolone activity against isogenic *Escherichia coli* isolates with mutations in *gyrA* and *parC*. Antimicrob Agents Chemother 2011;55: 1266–9.
[30] Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Pascual A, García I, Martínez-Martínez L. Correlation of quinolone resistance levels and differences in basal and quinolone-induced expression from three *qnrA*-containing plasmids. Clin Microbiol Infect 2006;12:440–5.
[31] Hegde SS, Vetting MW, Mitchenall LA, Maxwell A, Blanchard JS. Structural and biochemical analysis of the pentapeptide repeat protein EfsQnr, a potent DNA gyrase inhibitor. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:110–7.
[32] Ruiz J, Gómez J, Navia MM, Ribera A, Sierra JM, Marco F, et al. High prevalence of nalidixic acid resistant, ciprofloxacin susceptible phenotype among clinical isolates of *Escherichia coli* and other Enterobacteriaceae. Diagn Microbiol Infect Dis 2002;42:257–61.
[33] Wain J, Hoa NT, Chinh NT, Vinh H, Everett MJ, Diep TS, et al. Quinolone-resistant *Salmonella typhi* in Viet Nam: molecular basis of resistance and clinical response to treatment. Clin Infect Dis 1997;25:1404–10.
[34] Cesaro A, Bettoni RRD, Lascols C, Mérens A, Soussy CJ, Cambau E. Low selection of topoisomerase mutants from strains of *Escherichia coli* harbouring plasmid-borne *qnr* genes. J Antimicrob Chemother 2008;61:1007–15.
[35] Sato T, Yokota S, Uchida I, Okubo T, Ishihara K, Fujii N, et al. A fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clinical isolate without quinolone resistance-determining region mutations found in Japan. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:3964–5.
[36] Gunell M, Webber MA, Kotilainen P, Lilly A, Caddick JM, Jalava J, et al. Mechanisms of resistance in nontyphoidal *Salmonella enterica* strains exhibiting a nonclassical quinolone resistance phenotype. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:3832–6.
[37] de Toro M, Rojo-Bezares B, Vinué L, Undabeitia E, Torres C, Sáenz Y. In vivo selection of *aac(6′)-Ib-cr* and mutations in the *gyrA* gene in a clinical *qnrS1*-positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104B strain recovered after fluoroquinolone treatment. J Antimicrob Chemother 2010;65:1945–9.
[38] Ribera A, Doménech-Sanchez A, Ruiz J, Benedi VJ, Jimenez de Anta MT, Vila J. Mutations in *gyrA* and *parC* QRDRs are not relevant for quinolone resistance in epidemiological unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. Microb Drug Resist 2002;8:245–51.
[39] Alonso A, Martínez JL. Cloning and characterization of SmeDEF, a novel multidrug efflux pump of *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:3079–86.
[40] Ribera A, Jurado A, Ruiz J, Marco F, del Valle O, Mensa J, et al. In vitro activity of clinafloxacin in comparison with other quinolones against *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates in the presence and absence of reserpine. Diagn Microbiol Infect Dis 2002;42:123–8.
[41] Sánchez MB, Hernández A, Rodríguez-Martínez JM, Martínez-Martínez L, Martínez JL. Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as potential source of a novel family of Qnr determinants. BMC Microbiol 2008;8:148.
[42] Ahmed AM, Motoi Y, Sato M, Maruyama A, Watanabe H, Fukumoto Y, et al. Zoo animals as reservoirs of Gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. Appl Environ Microbiol 2007;73:6686–90.
[43] Guo L, Zhang J, Xu C, Zhao Y, Ren T, Zhang B, et al. Molecular characterization of fluoroquinolone resistance in *Haemophilus parasuis* isolated from pigs in South China. J Antimicrob Chemother 2011;66:539–42.
[44] Nakaminami H, Noguchi N, Sasatsu M. Fluoroquinolone efflux by the plasmid-mediated multidrug efflux pump QacB variant QacBIII in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:4107–11.
[45] Tran QT, Nawaz MS, Deck J, Nguyen KT, Cerniglia CE. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas putida* isolates from imported shrimp. Appl Environ Microbiol 2011;77:1885–7.
[46] Xia R, Guo X, Zhang Y, Xu H. *qnrVC*-like gene located in a novel complex class 1 integron harboring the IS*CR1* element in an *Aeromonas punctata* strain from an aquatic environment in Shandong Province, China. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:3471–4.
[47] Jacoby GA, Gacharna N, Black TA, Miller GH, Hooper DC. Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:1665–6.
[48] Warburg G, Korem M, Robicsek A, Engelstein E, Moses AE, Block C, et al. Changes in aac(6′)-Ib-cr prevalence and fluoroquinolone resistance in nosocomial isolates of *Escherichia coli* collected from 1991 through 2005. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:1268–70.
[49] Tran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:5638–42.
[50] Jacoby G, Cattoir V, Hooper D, Martínez-Martínez L, Nordmann P, Pascual A, et al. *qnr* gene nomenclature. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:2297–9.
[51] Quiroga MP, Andres P, Petroni A, Soler-Bistué AJC, Guerriero L, Vargas LJ, et al. Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including *aac(6′)-Ib-cr*, and a novel allele, *qnrB10*, associated with IS*CR1* in clinical enterobacterial isolates from Argentina. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:4466–70.
[52] Jacoby GA, Chow N, Waites KB. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:559–62.
[53] Minarini LAR, Poirel L, Cattoir V, Darini ALC, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. J Antimicrob Chemother 2008;62:474–8.
[54] Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. Lancet Infect Dis 2006;6:629–40.
[55] Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:2242–8.
[56] Vetting MW, Hegde SS, Fajardo JE, Fiser A, Roderick SL, Takiff HE, et al. Pentapeptide repeat proteins. Biochemistry 2006;45:1–10.
[57] Ellington MJ, Woodford N. Fluoroquinolone resistance and plasmid addiction systems: self-imposed selection pressure? J Antimicrob Chemother 2006;57:1026–9.
[58] Garrido MC, Herrero M, Kolter R, Moreno F. The export of the DNA replication inhibitor microcin B17 provides immunity for the host cell. EMBO J 1988;7:1853–62.
[59] Montero C, Mateu G, Rodriguez R, Takiff H. Intrinsic resistance of *Mycobacterium smegmatis* to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:3387–92.
[60] Chatterji M, Nagaraja V. GyrI: a counter-defensive strategy against proteinaceous inhibitors of DNA gyrase. EMBO Rep 2002;3:261–7.
[61] Chatterji M, Senqupta S, Nagaraja V. Chromosomally encoded gyrase inhibitor GyrI protects *Escherichia coli* against DNA-damaging agents. Arch Microbiol 2003;180:339–46.
[62] Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:3050–2.
[63] Vetting MW, Hegde SS, Wang M, Jacoby GA, Hooper DC, Blanchard JS. Structure of QnrB1, a plasmid-mediated fluoroquinolone resistance factor. J Biol Chem 2011;286:25265–73.
[64] Xiong X, Bromley EH, Oelschlaeger P, Woolfson DN, Spencer J. Structural insights into quinolone antibiotic resistance mediated by pentapeptide repeat proteins: conserved surface loops direct the activity of a Qnr protein from a Gram-negative bacterium. Nucleic Acids Res 2011;39:3917–27.

[65] Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:118–25.
[66] Hegde SS, Vetting MW, Roderick SL, Mitchenall LA, Maxwell A, Takiff HE, et al. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. Science 2005;308:1480–3.
[67] Kreuzer KN, Cozzarelli RN. *Escherichia coli* mutants thermosensitive for deoxyribonucleic acid gyrase subunit A: effects on deoxyribonucleic acid replication, transcription, and bacteriophage growth. J Bacteriol 1979;140:424–35.
[68] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 2011;28:2731–9.
[69] Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans of human origin. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:603–8.
[70] Hata M, Suzuki M, Matsumoto M, Takahashi M, Sato K, Ibe S, et al. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:801–3.
[71] Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, et al. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:1178–82.
[72] Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S, et al. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:1892–7.
[73] Fonseca EL, Dos Santos Freitas F, Vieira VV, Vicente ACP. New *qnr* gene cassettes associated with superintegron repeats in *Vibrio cholerae* O1. Emerg Infect Dis 2008;14:1129–31.
[74] Kim HB, Wang M, Ahmed S, Park CH, LaRocque RC, Faruque AS, et al. Transferable quinolone resistance in *Vibrio cholerae*. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:799–803.
[75] Hjerde E, Lorentzen MS, Holden MT, Seeger K, Paulsen S, Bason N, et al. The genome sequence of the fish pathogen *Aliivibrio salmonicida* strain LFI1238 shows extensive evidence of gene decay. BMC Genomics 2008;9:616.
[76] Poirel L, Liard A, Rodriguez-Martinez JM, Nordmann P. Vibrionaceae as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants. J Antimicrob Chemother 2005;56:1118–21.
[77] Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Mammeri H, Liard A, Nordmann P. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:3523–5.
[78] Cattoir V, Poirel L, Mazel D, Soussy CJ, Nordmann P. *Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated QnrS-like quinolone resistance determinants. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:2650–1.
[79] Saga T, Kaku M, Onodera Y, Yamachika S, Sato K, Takase H. *Vibrio parahaemolyticus* chromosomal *qnr* homologue VPA0095: demonstration by transformation with a mutated gene of its potential to reduce quinolone susceptibility in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:2144–5.
[80] Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Briales A, García I, Conejo MC, Pascual A. Qnr-like pentapeptide repeat proteins in Gram-positive bacteria. J Antimicrob Chemother 2008;61:1240–3.
[81] Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. Science 2004;304:67–74.
[82] Cheung TK, Chu YW, Chu MY, Ma CH, Yung RW, Kam KM. Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Hong Kong. J Antimicrob Chemother 2005;56:586–9.
[83] Velasco C, Rodríguez-Martínez JM, Briales A, Díaz de Alba P, Calvo J, Pascual A. Smaqnr, a new chromosome-encoded quinolone resistance determinant in *Serratia marcescens*. J Antimicrob Chemother 2010;65:239–42.
[84] Jacoby GA, Griffin C, Hooper DC. *Citrobacter* spp. as a source of *qnrB* alleles. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:4979–84.
[85] Gordon NC, Wareham DW. Novel variants of the Sm*qnr* family of quinolone resistance genes in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother 2010;65:483–9.
[86] Shimizu K, Kikuchi K, Sasaki T, Takahashi N, Ohtsuka M, Ono Y, et al. Sm*qnr*, a new chromosome-carried quinolone resistance gene in *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:3823–5.
[87] Wareham DW, Gordon NC, Shimizu K. Two new variants of and creation of a repository for *Stenotrophomonas maltophilia* quinolone protection protein (Sm*qnr*) genes. Int J Antimicrob Agents 2011;37:89–90.
[88] Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. In-vitro mutagenesis of *qnrA* and *qnrS* genes and quinolone resistance in *Escherichia coli*. Clin Microbiol Infect 2007;13:940–3.
[89] Guo Q, Weng J, Xu X, Wang M, Wang X, Ye X, et al. A mutational analysis and molecular dynamics simulation of quinolone resistance proteins QnrA1 and QnrC from *Proteus mirabilis*. BMC Struct Biol 2010;10:33.
[90] Rodríguez-Martínez JM, Briales A, Velasco C, Conejo MC, Martínez-Martínez L, Pascual A. Mutational analysis of quinolone resistance in the plasmid-encoded pentapeptide repeat proteins QnrA, QnrB and QnrS. J Antimicrob Chemother 2009;63:1128–34.
[91] Birmingham MC, Guarino R, Heller A, Wilton JH, Shah A, Hejmanowski L, et al. Ciprofloxacin concentrations in lung tissue following a simple 400 mg intravenous dose. J Antimicrob Chemother 1999;43(Suppl. A):43–8.
[92] Martens R, Wetzstein HG, Zadrazil F, Capelari M, Hoffmann P, Schmeer N. Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by wood-rotting fungi. Appl Environ Microbiol 1996;62:4206–9.
[93] Vetting MW, Park CH, Hegde SS, Jacoby GA, Hooper DC, Blanchard JS. Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside *N*-acetyltransferase AAC(6′)-Ib and its bifunctional, fluoroquinolone-active AAC(6′)-Ib-cr variant. Biochemistry 2008;47:9825–35.
[94] Maurice F, Broutin I, Podglajen I, Benas P, Collatz E, Dardel F. Enzyme structural plasticity and the emergence of broad-spectrum antibiotic resistance. EMBO Rep 2008;9:344–9.
[95] Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of *aac(6′)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:3953–5.
[96] Jung CM, Heinze TM, Strakosha R, Elkins CA, Sutherland JB. Acetylation of fluoroquinolone antimicrobial agents by an *Escherichia coli* strain isolated from a municipal wastewater treatment plant. J Appl Microbiol 2009;106:564–71.
[97] McCann J, Spingarn NE, Kobori J, Ames BN. Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. Proc Natl Acad Sci USA 1975;72:979–83.
[98] Winans SC, Walker GC. Identification of pKM101-encoded loci specifying potentially lethal gene products. J Bacteriol 1985;161:417–24.
[99] Poole K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. Ann Med 2007;39:162–76.
[100] Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:3801–4.
[101] Hansen LH, Johannesen E, Burmølle M, Sørensen AH, Sørensen SJ. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquindox in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:3332–7.
[102] Périchon B, Courvalin P, Galimand M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:2464–9.
[103] Szczepanowski R, Krahn I, Linke B, Goesmann A, Pühler A, Schlüter A. Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system. Microbiology 2004;150:3613–30.
[104] Yamane K, Wachino JI, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:3354–60.
[105] Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, Wachino J, Shibata N, Yagi T, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:491–6.
[106] Sørensen AH, Hansen LH, Johannesen E, Sørensen SJ. Conjugative plasmid conferring resistance to olaquindox. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:798–9.
[107] Kim HB, Wang M, Park CH, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:3582–4.
[108] Zhao J, Chen Z, Chen S, Deng Y, Liu Y, Tian W, et al. Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:4219–24.
[109] Hansen LH, Jensen LB, Sørensen HI, Sørensen SJ. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. J Antimicrob Chemother 2007;60:145–7.
[110] Périchon B, Bogaerts P, Lambert T, Frangeul L, Courvalin P, Galimand M. Sequence of conjugative plasmid pIP1206 mediating resistance to aminoglycosides by 16S rRNA methylation and to hydrophilic fluoroquinolones by efflux. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:2581–92.
[111] Yamane K, Wachino JI, Suzuki S, Arakawa Y. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:1564–6.
[112] Kim ES, Jeong JY, Choi SH, Lee SO, Kim SH, Kim MN, et al. Plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump gene, *qepA*, in *Escherichia coli* clinical isolates in Korea. Diagn Microbiol Infect Dis 2009;65:335–8.
[113] Paulsen IT, Brown MH, Littlejohn TG, Mitchell BA, Skurray RA. Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:3630–5.
[114] Duesberg CB, Malhotra-Kumar S, Goossens H, McGee L, Klugman KP, Welte T, et al. Interspecies recombination occurs frequently in quinolone resistance-determining regions of clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:4191–3.
[115] Janoir C, Podglajen I, Kitzis MD, Poyart C, Gutmann L. In vitro exchange of fluoroquinolone resistance determinants between *Streptococcus pneumoniae* and viridans streptococci and genomic organization of the *parE–parC* region in *S. mitis*. J Infect Dis 1999;180:555–8.
[116] Ferrándiz MJ, Fenoll A, Liñares J, De La Campa AG. Horizontal transfer of *parC* and *gyrA* in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:840–7.

Estudiar la presència de mecanismes transferibles de resistència a quinolones és important, perquè tot i que per si sols confereixen nivells baixos de resistència, faciliten i complementen la selecció de mecanismes addicionals de resistència, facilitant l'aparició de bacteris resistents. [101, 103, 111]

Estudis recents a l'Amèrica Llatina semblen indicar que existeix una distribució d'aquests mecanismes segons diferents espècies bacterianes, possiblement associats als mecanismes mòbils que transfereixen els gens de resistència. [101] S'ha observat que en espècies bacterianes associades a infeccions comunitàries, com *Salmonella* spp i *E. coli*, presenten majoritàriament el gen *qnrB*, concretament l'al·lel *qnrB19*, que es localitza en un petit plàsmid ColE1 [112], i no s'associa a la presència de resistència a cefalosporines, concretament de tipus BLEE. [113] Referent a les espècies aïllades més freqüents com a agents etiològics d'infeccions hospitalàries, com són *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella* spp. i *Serratia* spp., s'ha trobat més prevalentment el gen *qnrB10*, més associat a la presència d'un integró i amb relació directa amb la presència de microorganismes productors de BLEE. [101] Estudis que observen l'entorn genètic d'aquest gens, troben una associació entre el gens *qnrB10* i *qnrB2* i la seqüència ISCR1. Mentres que el gen *qnrB19* es troba en varis entorns genètics diferents; suggerint així que varis elements mòbils estan involucrats en la seva mobilització, explicant així que es trobi àmpliament distribuït arreu. [101]

En les últimes dècades hi ha hagut un augment dels TMQR a nivell mundial, especialment en *Enterobacteriaceae*, [111, 114] tot i la limitació que aquests valors estiguin subestimats ja que molts estudis s'han fet seleccionant soques amb un nivell alt de resistència a quinolones, o només s'han cercat en soques amb presència de BLEE, no donant valors reals de prevalences de TMQR en les diferents àrees. [100] [112] Un dels reptes actuals consisteix en dissenyar sistemes de detecció d'aquests mecanismes a nivell de diagnòstic clínic, per la seva implicació en la facilitació de futures falles terapèutiques. [101, 103]

La rifaximina

La rifaximina (RFX), ja introduït en l'apartat de tractament de la DV, és un derivat semisintètic de la rifamicina, amb una bona activitat *in vitro* tant en bacteris gramnegatius com en grampositius, aeròbics i anaeròbics. (Figura 6) Una de les seves característiques és no ser quasi absorbible a nivell del tracte intestinal, degut a la possessió d'un anell de pyridoimidazole addicional, evitant així l'accés a la circulació sistèmica, presentant una biodisponibilitat menor que el 0,4% tant en sang com en orina. Com a conseqüència, arriba a grans concentracions al lumen intestinal, de fins a 8000μg/g. [115, 116]

El mecanisme d'acció de la RFX consisteix en unir-se a la subunitat beta de la RNA polimerasa ADN depenent (codificada pel gen *rpoB*), suspenent així l'activitat de replicació del material genètic del bacteri. [115]

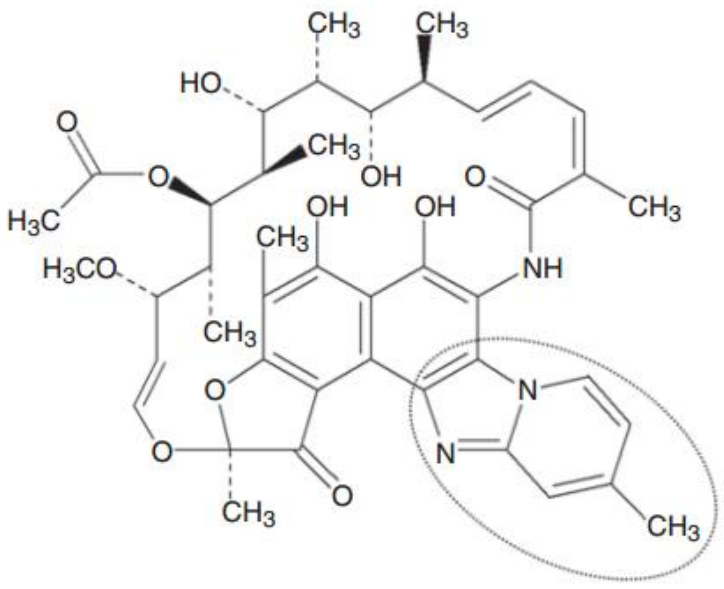


Figura 6: Estructura química de la RFX. Es resalta el seu anell pyridoimidazole, que fa que la RFX no sigui absorbible. [117]

La RFX va ser aprovada per primera vegada a Itàlia, l'any 1987, i seguidament s'ha autoritzat l'ús a més de 30 països per tractar patologies intestinals severes, també s'associa a millores del tractament de la malaltia de Crohn, encefalopatia hepàtica, entre d'altres, així com també la diarrea del viatger. [118, 119] Mostra una bona tolerància i efectivitat *in vivo*. [120]

Existeixen diferents estudis que mostren que aquest antibiòtic posseeix una bona activitat *in vitro* contra els principals bacteris causants de diarrea, excepte en el cas de *Campylobacter* spp. I *Yersinia* spp. [121] I a la pràctica, s'ha demostrat que la RFX, juntament amb altres antimicrobians no absorbibles com la bicozamicina o l'aztreonam, són efectius també per tractar la DV. [37]

L'existència d'estudis clínics mostren que la RFX posseeix una eficàcia superior, comparada amb el grup placebo, i comparable a un antibiòtics que s'absorbeix a nivell sistèmic, com per exemple la ciprofloxacina o el cotrimoxazole, en la reducció de la durada de la malaltia, i pal·liament dels símptomes. [122] A més no s'ha vist que tingui interaccions amb altres tipus de fàrmacs, com per exemple antimalàrics, que podria tenir rellevància en viatgers a zones tropicals que realitzen profilaxi o tractament del paludisme.

Al ser un antibiòtic que no s'absorbeix a nivell intestinal, i per tan quasi no arriba a la circulació sistèmica, seria útil per tractar infeccions en nens i/o dones embarassades. [37] Malgrat tots aquests beneficis, no s'ha demostrat que la RFX, a la pràctica, presenti una gran eficàcia contra bacteris invasius. [122]

A part de la seva activitat bactericida, se li atribueixen altres capacitats que podrien contribuir a la seva eficàcia en els tractament de patologies intestinals causades per patògens bacterians. S'ha descrit que la RFX produeix alteracions en l'expressió de factors de virulència en els bacteris aïllats de DV exposats a concentracions subinhibitòries aquest antimicrobià. Concretament en ETEC s'ha vist que després de l'exposició deixa d'expressar les toxines LT i ST, així com diferents factors de colonització (CS2/CS3, CS6) i que les EAEC i les *Shigelles* deixen d'expressar una metaloproteinasa de la matriu (MMP-9). Alhora també s'observa una reducció en les citoquines, la interleuquina IL-8 passa a ser indetectable. [123]

Tot i que la RFX s'usa ja per tractar desordres gastrointestinals, es coneix poc dels seus mecanismes terapèutics i quins són els seus efectes al pacient. Recentment en models *in vitro,* s'ha vist que prevé la inflamació de la mucosa i evita el deteriorament de la funció de la barrera intestinal. [123] S'ha demostrat també, que aquest antimicrobià afecta la fisiologia de la cèl·lula epitelial intestinal, alterant la infectivitat dels patògens entèrics i la inflamació intestinal. Aquestes dades suggereixen que la RFX confereix citoprotecció contra el procés de colonització i infecció de determinats patògens. Però

aquest efecte protector no succeeix amb tots els microorganismes, s'ha vist que després del tractament amb RFX, les EAEC no són capaces d'unir-se a l'epiteli i per tant incapaces de causar la infecció, però si que ho poden seguir fent les *Shigelles*. [124]

Al contrari del que succeeix habitualment amb la ingestió d'antimicrobians, la RFX no altera de manera important la microbiota intestinal humana [125], en aquest sentit estudis recents realitzats *in vitro,* concretament en models de ratolins que han estat sotmesos a un estres per causar desordres intestinals, s'ha observat que si hi ha una alteració de la comunitat de microorganismes de l'ili, observant només una major presència de *Lactobacillus*. [126]

Mecanismes de resistència:

S'han relacionat diferents mutacions en el gen *rpoB* amb l'adquisició de resistència a derivats de la rifamicina, com ara la rifampicina. Aquestes mutacions s'agrupen en tres regions altament conservades en la porció mitjana del gen *rpoB*. El grup I inclou els codons 505-537, del grup II els codons 563-575 i el grup III té els codons 684-690. [126, 127] També influeixen en la resistència les bombes d'expulsió, i en els últims anys s'ha descrit la presència de mecanismes de resistència transferibles, com els gens *arr (arr2, arr3, arr4, arr6* i *arr7)* en l'adquisició de resistències als derivats de la rifamicina. [128] [129] Això fa que no es pugui descartar una possible co-selecció de la resistència per l'ús d'agents relacionats.

S'ha estudiat el seu possible efecte sobre les resistències en la microbiota humana, quan la RFX s'usa com a profilaxi de la diarrea del viatger, no s'observen diferències significatives en la sensibilitat antimicrobiana pre i post tractament amb RFX, [125] fent pensar que l'ús d'aquest antibiòtic no selecciona l'aparició de resistències en el seu ús.

BOMBES D'EXPULSIÓ ACTIVA

Les bombes d'expulsió són proteïnes de transport que participen en l'expulsió fora del bacteri de diferents substàncies que els són tòxiques, incloent una bona part d'antimicrobians. Les bombes poden ser específiques per a un únic substrat o poden transportar una gran varietat de compostos, incloent antibiòtics de diferents famílies, podent contribuir a la resistència a diversos antimicrobians. Es divideixen en cinc famílies: MF , MATE, RND (inclouen AcrAB-TolC), SMR, i ABC. Tots aquests sistemes d'expulsió utilitzen els protons com a font d'energia, a excepció de la família ABC, que utilitza la hidròlisi d'ATP per impulsar l'exportació de substrats. (Figura 7)
Aquest sistema de bombes depenent d'energia han estat descrits en bacteris d'importància clínica, com és l'exemple de *Campylobacter jejuni* CmeABC, o AcrAB-Tolc , AcrEF-Tolc , EmrB , EmrD a *E. coli*. El seu paper en la resistència s'ha demostrat bastament a nivell *in vitro*, on experiments amb deleccions de bombes tipus AcrAB-TolC, augmenten la sensibilitat de determinats bacteris a diferents antimicrobians com per exemple penicilines, fenicols, macròlids, quinolones o tetraciclines. [130]

Aquests mecanismes contribueixen a la resistència "basal" als antibiòtics als bacteri gramnegatius. I és important en l'aparició de multiresistències, ja que un sol tipus de bomba d'expulsió, pot conferir resistència simultània a una àmplia gamma d'agents antimicrobians, fent que els bacteris esdevinguin multiresistents. [131]

Així l'efecte de les bombes d'expulsió en la resistència s'ha de considerar en el disseny d'estudis d'antimicrobians, així com el paper dels inhibidors per tal d'avaluar possibles nous tractament combinats. [132, 133]

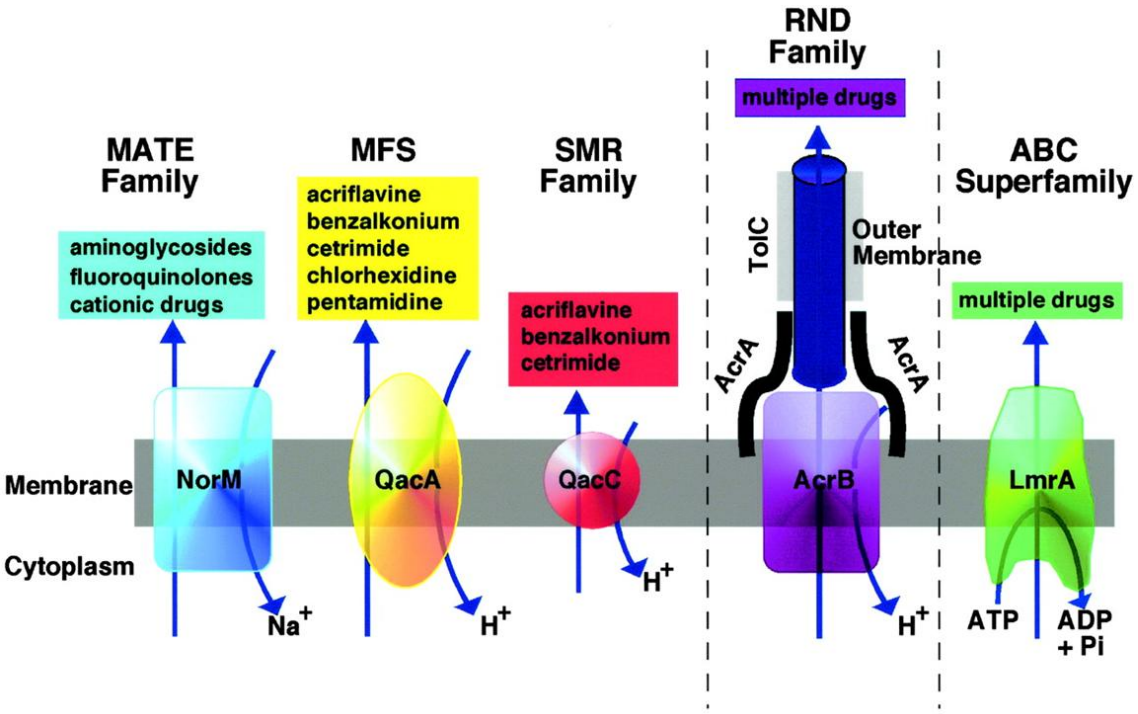


Figura 7: Esquema de les principals families de bombes d'expulsió bacterianes. [133]

Inhibidor de bombes d'expulsió

Malgrat que fins al moment no s'han introduït en la pràctica clínica inhibidors de bombes d'expulsió, diferents inhibidors han estat estudiats per dissenyar futurs tractaments més efectius. [134] Es creu que l'ús d'aquest tipus d'estratègies podria facilitar la reintroducció d'antimicrobians ja no efectius en l'actualitat, com podria ser en determinats casos la ciprofloxacina, evitant així el continu creixement de les soques multiresistents a antimicrobians. [135] Cada vegada més, augmenta la prevalença de bacteris patògens que presenten una sobreexpressió de les bombes d'expulsió, conferint resistència al bacteri i afavorint l'aparició de MDR. [131] Així, la sobreexpressió d'una única bomba pot proporcionar resistència als bacteris a una àmplia gamma no tan sols d'antibiòtics, sinó també de productes químics. Aquest fenomen ha estat descrit tan en bacteris grampositius com gramnegatius, posant de manifest la necessitat urgent de nous fàrmacs o noves teràpies de combinació per tractar les infeccions causades per patògens humans resistents com serien *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *Mycobacterium tuberculosi*. [135]

S'han explorat diferents inhibidors de bombes d'expulsió, com per exemple l'artesunat, un compost que en l'actualitat s'usa com a tractament de la malària. S'ha demostrat que l'artesunat augmenta la sensibilitat d'alguns bacteris, com per exemple *E. coli*, augmentant l'acumulació d'antibiòtics β-lactàmics través de la inhibició de les bombes d'expulsió de tipus AcrAB-Tolc. [136] A més aquest compost presentaria l'avantatge de tenir una aplicació en humans, ja que el seu ús en clínica és una realitat. S'ha explorat també l'efecte en derivats de la rifamicina en possibles sinergies de diferents inhibidors de bombes d'expulsió, com per exemple 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine i phenyl-arginine-β-naphthylamide (PAβN). [137-139] El PAβN és un dels inhibidors més estudiats *in vitro*, incloent estudis amb diferents antimicrobians, mirant com varia la CMI en presència o absència del PAβN. [75, 138, 140] Fins a l'actualitat aquest inhibidor, el PAβN, només s'utilitza *in vitro*, per veure la implicació de les bombes d'expulsió en les resistències, però fins al moment no ha estat autoritzat el seu ús en humans. [138]

RESISTÈNCIA A ANTIMICROBIANS I AMBIENT

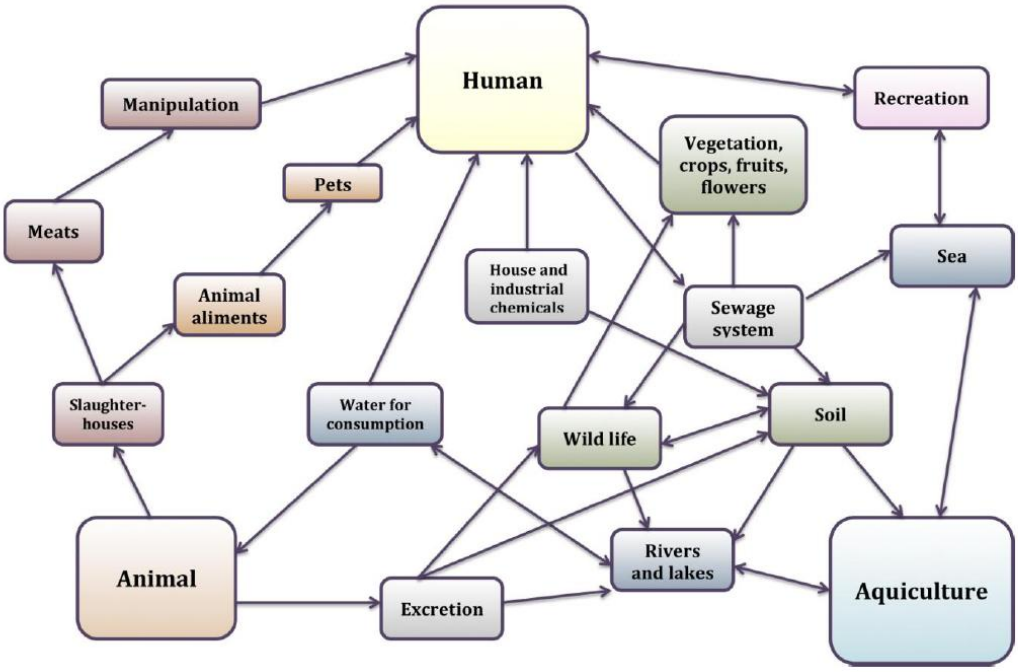


Figura 8: Representació esquemàtica de la interacció a diferents nivells ambientals.

Els antibiòtics presents a l'ambient exerceixen una forta pressió selectiva per a la propagació de la resistència i seleccionen factors que promouen la propagació d'aquesta.

La interconnexió de tots els entorns, tant l'humà, l'animal i l'aqüicultura, és evident. (Figura 8) Els microorganismes tenen la capacitat d'estar presents en tots aquests ambients, i per tant aquesta compartimentalitzció, però alhora connexió, s'ha de tenir en compte per estudiar la resistència a antimicrobians, per tal d'obtenir una visió el més general possible.

La presència de substàncies específiques, traces d'antibiòtics o, directament, els microorganismes resistents als antibiòtics en la cadena alimentària, no es deu exclusivament a la utilització d'agents antibacterians durant la manipulació dels aliments, sinó també a l'ús antibiòtics en el tractament d'animals de granja o l'ús

d'antibiòtics, legal o il·legal, (segons la legislació pròpia de cada país) com a promotors de creixement. [141]

S'han descrit altres factors, com l'ús de fertilitzants orgànics, el reg de vegetals, la presència de contaminants en les zones de pesca, les condicions de manipulació d'aliments o les condicions sanitàries dels establiments comercials on es venen els aliments, també s'han de tenir en compte pel que fa a la propagació de la resistència als antibiòtics. [141]

RESISTÈNCIA A ANTIMICROBIANS EN LA MICROBIOTA

"El cos humà és, en realitat, un ecosistema ampli i canviant compost per milers de milions d'organismes microbians, conegut col·lectivament com a microbioma" segons Rapial *et al*. [142] destacant-se que ens els últims anys, estudiar l'impacte d'aquest microbioma en relació amb la salut dels humana ha estat un tema a l'alça. Així, s'estudia la seva possible implicació i el paper que exergeix en moltes malalties o processos. [142]

Els bacteris comensals tenen un paper important també en la propagació de la resistència als antibiòtics i és reconegut que el seu estudi és un component important per abordar la preservació de l'eficàcia dels antimicrobians i abordar la contenció de la dispersió de la resistència als mateixos. A excepció de malalties com la tuberculosi, la majoria de les malalties infeccioses causades per bacteris es deuen a organismes comensals, com ara *E. coli* o membres dels gèneres *Streptococs* o *Staphylococs*. Es creu que aquests microorganismes de la flora natural, com ara membres de l'intestí o la cavitat bucal, al trobar-se en entorns on els bacteris es troben en una elevada densitat i proximitat, la probabilitat de que es donin processos de transferència de gens és més gran. [131]

Els membres comensals pateixen la pressió antibiòtica directa que s'exerceix durant els tractaments amb antibiòtics, però també una pressió indirecta que pot estar relacionat amb la presència de traces d'antibiòtics o altres substàncies, en la cadena d'aliments, o

amb el trànsit dels microorganismes que presenten resistència als antibiòtics, i que podrien convertir-se en residents o transferir els seus elements genètics de resistència a antibiòtics als membres permanents de la microbiota intestinal. Així, els microorganismes comensals actuen com a reservoris de gens de resistència i com a possibles patògens oportunistes resistents a antimicrobians. [131]

Estudiar les resistències a antimicrobians en aquests organismes es considera com un marcador de l'exposició als antimicrobians en una població determinada i s'utilitza com a model per entendre aquesta complexitat.

RESISTÈNCIA ANTIMICROBIANA ALS PAÏSOS DE MITJA-BAIXA RENDA

Tenint en compte que els antibiòtics juguen un paper crucial en la reducció de la morbiditat i mortalitat causades per infeccions bacterianes, la resistència als antibiòtics és un problema important en països de mitja i baixa renda, que es caracteritzen per tenir una alta càrrega de malalties infeccioses, i és on les taxes de resistència són encara més grans que als països industrialitzats. [143, 144] [39]

La resistència a antimicrobians és un problema que als països de mitja-baixa renda pren un interès especial, al presentar escassa disponibilitat de recursos, tant a nivell de diagnòstic i tractaments empírics, com d'opcions terapèutiques adequades. D'aquesta manera són varis els factors que contribueixen que la resistència a antimicrobians sigui tan important als països de mitja-baixa renda, la majoria relacionats amb la limitació de recursos. Així, la presència d'opcions terapèutiques limitades, més el dèficit d'instal·lacions adequades de laboratori per un correcte diagnòstic, i, en alguns casos, antimicrobians fraudulents, accés insuficient als sistemes de salut, dispensació de medicaments per persones amb poca formació tenen una incidència directa en el desenvolupament i extensió d'aquest fenòmen. Se li suma, la presència d'opcions terapèutiques escasses, o no disponibles a nivell logístic o de cost econòmic elevat o un mal ús dels antimicrobians disponibles. [3, 145] A més a més presenten una manca d'alternatives als antibiòtics en ús, que sumat a la manca de coneixement de les dades

microbiològiques locals i els patrons de resistència corresponents de cada àrea, l'automedicació, la pressió social sobre els metges... entre altres factors dóna lloc a unes característiques que afavoreix l'augment de les taxes de resistència als antimicrobians. [146, 147]

És en aquests països on hi ha una elevada càrrega de malalties de caire infecciós. La transmissió dels bacteris es veu facilitada en aquestes regions, sobretot per la manca d'higiene, a través del contacte persona-persona, amb aliments contaminats, aigua no potable o per l'existència de vectors específic que expliquen l'elevada presència de malaties infeccioses. [3, 144]

Així la resistència a antimicrobians en aquests països presenta un escenari multifactorial i força complex, i la comprensió és crucial per desenvolupar qualsevol estratègia de control basada en la promoció d'un ús correcte d'antibiòtics i exergir mesures pel control de les infeccions. [144]

Tot i que sovint la vigilància de la resistència en molts països en desenvolupament no és del tot adequada, les dades disponibles suggereixen que la resistència ha arribat a nivells inacceptables en els patògens més comuns en aquests països, valors de 100% de resistència a antimicrobians, i les tendències mostren nous increments en els darrers anys. [148] Les resistències més grans es troben en els antimicrobians usats tradicionalment en aquests països, que solen ser els que estan disponibles, tenir un baix cost baix cost, i correspon als antimicrobians més antics. [148] Aquest és el cas de l'ampicil·lina, cotrimoxazole i tetraciclina que en països amb pocs recursos, poden arribar a nivells de resistència superiors al 80%. [111, 149-152]

RESISTÈNCIA A ANTIMICROBIANS A L'AMÈRICA LLATINA

L'aparició i propagació de la resistència als antimicrobians a Amèrica Llatina contribueix a l'amenaça mundial que és la lluita contra la propagació de les malalties infeccioses bacterianes. En aquests països la resistència a antimicrobians es deu a diferents causes, però sobretot a l'ús inadequat d'antibiòtics disponibles, canvis ambientals i el ràpid creixement de la població, que s'ha traslladat massivament a les grans ciutats, que sovint no han pogut absorbir l'allau poblacional d'una manera ordenada, creixent formant suburbis de manera anàrquica i en condicions higièniques i de sanejament moltes vegades inadequades. A tot això se li sumen problemes de base, com la desnutrició, que té una incidència directa en el sistema immune, i fins i tot actituds socioculturals que incideixen en un mal ús dels medicaments. [146, 147]

Aquestes actituds es veuen reflectides, per exemple, en la creença que qualsevol antimicrobià pot guarir qualsevol malaltia, així l'automedicació i la venda sense control d'antibiòtics han exercit un paper fonamental en la disseminació i ràpid creixement de les resistències en aquesta regió. Tanmateix un altre punt important es el pautat incorrecte dels antimicrobians, ja sigui pel propi fet de l'automedicació, o per un absència de seguiment de la informació rebuda o la durada incorrecta dels tractaments, sovint relacionada amb el cost dels antibiòtics, que duu a l'abandonament dels mateixos davant l'aparició dels primers símptomes de millora; en ambdós casos el resultat es que els microorganismes poden quedar exposats a concentracions subinhibitories d'antimicrobians, o a la retirada de la medicació abans de l'eliminació del microorganisme patogen, afavorint la selecció de soques bacterianes amb resistència minvada o directament resistents. [144]

Als darrers anys la resistència als antibiòtics és un problema creixent a Amèrica Llatina. [111] S'han establert sistemes de vigilància, però és necessari un bon ús i selecció dels antibiòtics segons les dades epidemiològiques locals.

HIPÒTESIS

Al ser Perú un país de mitja-baixa renda, que no presenta unes polítiques de control en venda i ús d'antimicrobians, i no hi ha regulacions en l'ús d'aquests en veterinària, es creu que les soques implicades en diarrea i les comensals presenten elevada resistència als principals tractaments antibiòtics usats a Lima per la diarrea infantil, com el que succeeix a nivell mundial. I per tan es creu que aquest augment en la resistència antimicrobiana global, també afecta a Lima i la seva àrea periurbana.

Els mecanismes moleculars implicats en la resistència a antibiòtics en soques DEC i comensals a Perú estan pocs estudiats, així succeeix en d'altres països de mitja-baixa renda. Les resistències descrites a Perú s'expliquen pels mecanismes moleculars més freqüentment trobats.

Calen alternatives antimicrobianes per tractar la diarrea infantil, i es pensa que la RFX pot ser una bona alternativa ja que s'ha demostrat com a tractament eficaç en la DV.

La RFX pot ser un bon tractament d'enteropatògens si no presenta molta facilitat en seleccionar mutacions de resistència, o si aquestes afecten a la fitness bacteriana.
Els estudis fets *in vitro* sobre la selecció de resistències a RFX, son representatiu del que passa a la comunitat en soques clíniques.

OBJECTIUS

1- Avaluar els nivells de resistència a antimicrobians en mostres pediàtriques de diarrea infantil de zones periurbanes de Lima.

1.1- Establir la sensibilitat als antimicrobians usats com a tractaments antibiòtics actuals, tan a nivell fenotípic com molecular, caracteritzant els gens causants de la resistència a antibiòtics ens els microorganismes aïllats de nens amb diarrea o sense.

1.2- Estudiar els mecanismes moleculars implicats en la resistència a antimicrobians que no s'usen en l'àrea en aquesta franja d'edat, com les quinolones.

2- Determinar la potencialitat de la RFX com a alternativa als antimicrobians en ús actualment.

2.1- Observar l'activitat de la RFX en soques clíniques aïllades en pacients de DV o infants en diarrea i sans.

2.2- Determinar la freqüència i estabilitat de creació de resistències a la RFX.

2.3- Determinar els mecanismes moleculars implicats en la resistència a RFX, tant en soques de mutants *in vitro* com d'origen clínic.

METODOLOGIA

1- **Perú**

Àrea i població d'estudi

Els estudis es dugueren a terme a Perú, concretament a la seva àrea periurbana de Lima. Recordar que Perú, un país de mitja-baixa renda, situat a l'Amèrica Llatina, ocupa la plaça 62 de 132 països segons el valor de l'índex de desenvolupament humà (IDH). Dades demogràfiques situen al voltant de 30 milions de persones la població d'aquest país, i concretament a l'àrea de Lima es situen prop de 10 milions de persones amb una elevada densitat poblacional (272,2 habitants/Km^2). Dades socio-econòmiques de la direcció General d'Epidemiologia del Ministeri de Salut Peruà, mostren un 25,8% de percentatge de pobresa, i un elevat índex d'alfabetització (91,9%). [153]

Les dades mostren que aquest país està en plena "transició" epidemiològica, amb gran esperances de vida, prop de 74 anys, però amb un elevat percentatge de la població per sota dels 15 anys. La mortalitat infantil és de 21 per 1000 nascuts vius, i una elevada taxa de mortalitat atribuïble a malalties transmissibles (106.05 per 100.000 habitants). Presenta una desnutrició global de 3,4% en menors de 5 anys, i una desnutrició crònica del 18,1%.[153]

A l'observar la incidència de diarrea aguda en menors de 5 anys, segons dades del Sistema Nacional de Vigilància-MINSA-DGE-RENACE- al 2007 hi havia 2.722 casos per 10.000 habitants, amb prop de 750 mil episodis de diarrea aguda anual, i concentrant-se a l'àrea de Lima.

Descripció de l'estudi d'on provenen les mostres:

Estudi número D/019499/08 finançat per l'Agència Espanyola de Cooperació i Desenvolupament AECID. L'estudi de cohort es realitzà al Perú, al districte de Lima. (Figura 9) L'objectiu fou realitzar el seguiment d'una cohort de 1025 infants, amb diarrea i sense (controls), entre 2 i 12 mesos d'edat del Cono sur de Lima, concretament en 4 zones periurbanes (Chorrillos, San Juan de Miraflores, Villa María del Triunfo i Villa el Salvador). Els infants van entrar en l'estudi després d'haver obtingut el consentiment informat dels pares/mares o tutors legals. Aquest projecte va ser revisat i aprovat pel Comitè d'Ètica de l'"Instituto de Investigación Nutricional and Universidad Peruana Cayetano Heredia", Lima, Perú. [154]

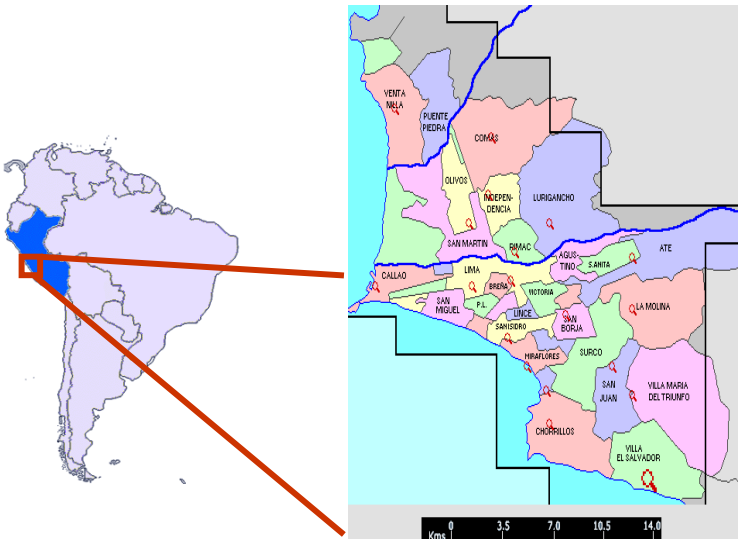


Figura 9: Mapa del Perú. Situació zona estudi.

Les mostres de diarrea es captaren als centres de salut, mentre que els controls es van recollir a la comunitat, buscant la màxima similitud en espai (barri), sexe, edat, i amb el criteri de que no haguessin sofert diarrea o cap procés infecciós en els 15 dies anteriors a la recollida de les mostres. Les mostres eren guardades en fred, com a màxim 6 hores, fins al seu processament i identificació. [154]

Els microorganismes es varen aïllar i identificar mitjançant la utilització de tècniques clàssiques (identificació bioquímica) i el caràcter diarreogènic de les soques *d'E. coli*

s'establí gràcies a la tècnica de reacció en cadena de la polimerasa (PCR) múltiplex. [154, 155]

La incidència d'episodis de diarrea d'aquest estudi que requeriren atenció mèdica fou d'1.5 episodis/nen/any. La prevalença de les *E. coli* diarreogèniques fou de 28.9% (161/557) i de 29.7% (58/195) a les mostres de diarrea i de control, respectivament. [154] Malgrat això, s'observà una tendència, encara que no estadísticament significativa, d'un major aïllament d'alguns patotipus (DAEC, EAEC) a les mostres de diarrea versus les de control en nens de major edat.

2- Unitat de Medicina Tropical de l'Hospital Clínic de Barcelona

La Unitat de Medicina Tropical de l'Hospital Clínic de Barcelona es creà al 1983, per a respondre a les necessitats del creixent nombre de viatgers cap a zones tropicals i subtropicals, agafant l'embranzida definitiva a la dècada dels 90, quan el fenomen del turisme internacional s'arrelà de manera estable al nostre país. A l'actualitat, i des fa ja uns anys la Unitat funciona com a Centre de Referència de malalties tropicals i importades de Catalunya, essent un dels referents del panorama espanyol.
A l'actualitat la Unitat té dues vessants diferenciades; la d'atenció pre-viatge, adreçada a informar de les mesures preventives i profilàctiques per a evitar l'adquisició de malalties al llarg del decurs dels viatges, a proporcionar les vacunes adients en funció de la destinació, durada i tipus de viatge, així com a donar informació referent a les mesures bàsiques a instaurar en cas de patir alguna malaltia al llarg del viatge, com ara un procés diarreic; l'altre vessant es la post-viatge, tant adreçada al tractament de viatgers amb malalties importades, com, de manera creixent, al tractament de població immigrada amb malalties infeccioses.

A l'actualitat la unitat de Medicina Tropical rep cada any aproximadament 1200 malalts, dels quals uns 350 es fan visitar per patir, o haver patit al llarg del decurs del viatge, un quadre diarreic. Cal esmentar que malgrat la "benignitat" de la malaltia, un percentatge de malalts no guareixen i, encara que sense diarrea activa, romanen amb

problemes intestinals que poden derivar en el desenvolupament d'un síndrome inflamatori intestinal crònic, malauradament, degut precisament a la natura indefinida dels símptomes molt sovint no retornen a la consulta, essent difícil així saber el nombre aproximats de casos reals. Tanmateix s'han reportat casos en viatgers d'infeccions secundaries associades a un previ procés diarreic, com es el cas del desenvolupament d'abscessos a diferents òrgans. [156] Aquestes diarrees son produïdes, com s'ha esmentat per una gran diversitat de patògens i la incidència dels mateixos s'associa a les destinacions visitades. Així els principals patògens causants de diarrea al nostre hospital son ETEC i EAEC que s'aïllen a un 15-16% de les diarrees totals. Indicar, tanmateix, que un percentatge important, del 30-40% de diarrees, segueix sense diagnòstic etiològic.

RESULTATS

ARTICLE 1

"Molecular mechanisms of antibiotic resistance in diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolated from children"

Susan Mosquito, Joaquim Ruiz, Maria J. Pons, David Durand, Francesca Barletta, Theresa J. Ochoa

International Journal Antimicrobial Agents. 2012 Dec;40(6):544-8.

ARTICLE 2

"Levels of quinolones resistance and other antimicrobial in non-pathogenic Escherichia coli strains in children from the periurban area of Lima, Peru"

Maria J. Pons, Susan Mosquito, Theresa J. Ochoa, Martha Vargas, Margarita Molina, Angela Lluque, Ana I. Gil, Lucie Ecker, Francesca Barletta, Claudio F. Lanata, Luis Javier Del Valle, Joaquim Ruiz.

Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. 2012 Mar;29(1):82-6.

ARTICLE 3

"Analysis of quinolone-resistance in comensal and diarrheagenic *Escherichia coli* isolates from infants in Lima, Peru"

Maria J. Pons, Susan Mosquito, Claudia Gomes, Luis J. del Valle, Theresa J. Ochoa, Joaquim Ruiz.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.2014. 108 (1): 22-28
doi:10.1093/trstmh/trt10

ARTICLE 4

"Antimicrobial resistance in *Shigella* spp. causing traveller's diarrhoea (1995-2010): A retrospective analysis"

Maria J. Pons, Claudia Gomes, Sandra Martínez-Puchol, Lídia Ruiz, Laura Mensa, Jordi Vila, Joaquim Gascón, Joaquim Ruiz.

Travel Medicine and Infectious Diseases. 2013 Jul 23. doi:pii: S1477-8939(13)00103-8.
10.1016/j.tmaid.2013.06.010.

ARTICLE 5

"*In vitro* antimicrobial activity of rifaximin against enteropathogens causing traveler's diarrhea"

Joaquim Ruiz, Laura Mensa, Cristina O'Callaghan, Maria J Pons, A. González, Jordi Vila, Joaquim Gascón.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2007 Dec;59(4):473-5.

ARTICLE 6

"Development of *Escherichia coli* rifaximin-resistant mutants: frequency of selection and stability"

Joaquim ruiz, Laura Mensa, Maria J. Pons, Jordi Vila, Joaquim Gascón.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2008 May;61(5):1016-9.

ARTICLE 7

"Fitness and molecular mechanisms of resistance to rifaximin in *in vitro* selected *Escherichia coli* mutants"

Maria J. Pons, Laura Mensa, Joaquim Gascón, Joaquim Ruiz.

Microb Drug Resist. 2012 Aug;18(4):376-9.

ARTICLE 8

"Relevant role of efflux pumps in high levels of rifaximin resistance in *Escherichia coli* clinical isolates"

Claudia Gomes, Lidia Ruiz, Maria J. Pons, Theresa J. Ochoa, Joaquim Ruiz

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2013 Sep;107(9):545-9

ARTICLE 1

Molecular mechanisms of antibiotic resistance in diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolated from children

Mecanismes moleculars de resistència en soques d'*Escherichia coli* aïllades en infants

Mosquito S, Ruiz J, **Pons MJ**, Durand D, Barletta F, Ochoa TJ

International Journal of Antimicrobials Agents. 2012 Dec;40(6):544-8.

RESUM

Les *E. coli* diarreogèniques (DEC) són una de les principals causes de diarrea en els nens i s'associen amb alta resistència als antibiòtics. No obstant això, hi ha pocs estudis sobre els mecanismes moleculars de resistència en aquest grup de bacteris, sobretot a l'Amèrica llatina. Per facilitar la selecció d'un antibiòtic empíric adequat, és important tenir un coneixement dels patrons locals de sensibilitat als antibiòtics.

L'objectiu d'aquest estudi va ser determinar els mecanismes associats a la resistència als antibiòtics a un total de 369 soques d'*E. coli* (74 soques comensals i 201 soques diarreogèniques aïllades de nens amb diarrea (DEC-diarrea) i 94 sense (DEC-control) provinents de nens menors d'un any d'edat. Les mostres es recolliren a districtes periurbans de Lima, Perú.

Sorprenentment, les soques comensals eren freqüentment més resistents a l'àcid nalidíxic i ciprofloxacina (68% i 28%, respectivament) que les soques DEC (23% i 2%, respectivament) ($P<0,05$). Les soques DEC provinents de diarrea van ser més resistents a cotrimoxazole (78%) en comparació amb les soques DEC provinents de control (65%) i que les comensals (60%) ($P< 0,05$).

A l'observar els mecanismes moleculars de resistència trobats amb més freqüència es va trobar: per β-lactàmics, bla_{TEM} (31%, 37/118), per a sulfonamides, *sul2* (48%, 49 /103), per a tetraciclina, *tet(A)* (27%, 23/84) i per al cloramfenicol, *cat* (80%, 28/35).

A l'observar la presència de mecanismes de resistència segons els tipus de *E. coli* trobats, els gens *sul1* i *dfrA1*, relacionats amb la presència de resistència a cotrimoxazole, es van trobar més en el grup de DEC -diarrea (41% i 28%, respectivament) comparat amb els altres dos grups ($P < 0,05$) .

Destacar l'alt percentatge de resistència a cotrimoxazole i cloramfenicol, tant en soques DEC com comensals, correlacionat amb l'elevat ús generalitzat en el tractament de malalties associades a bacteris gramnegatius, especialment en nens menors de 2 anys d'edat amb infeccions de diarrea aguda. També és d'especial interès el fet que tan per ampicil·lina com per tetraciclina, malgrat analitzar la presencia dels principals mecanismes de resistència reportats en *E. coli*, n un percentatge important no es va trobar el mecanisme que donava la resistència.suggerint que hi ha altres mecanismes menys freqüents involucrats, o la implicació de les bombes d'expulsió, que podrien estar implicades en la resistència a múltiples fàrmacs

Com a conclusió, aquest estudi descriu detalladament per primera vegada els mecanismes moleculars de resistència en un gran nombre de soques DEC aïllades de nens amb diarrea i de controls sans a Perú, descrivint una alta diversitat de gens de resistència a les soques DEC, incloent les soques causants de símptomes diarreics.

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/ijantimicag

Short communication

Molecular mechanisms of antibiotic resistance in diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolated from children

Susan Mosquito[a], Joaquim Ruiz[b,c,d], María J. Pons[b], David Durand[a], Francesca Barletta[a], Theresa J. Ochoa[a,e,*]

[a] Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Ave. Honorio Delgado 430, Lima 31, Peru
[b] Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona, Hospital Clinic, Universitat de Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain
[c] Institut d'investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain
[d] Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública, Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain
[e] University of Texas, School of Public Health, Houston, TX, USA

ARTICLE INFO

Article history:
Received 31 January 2012
Accepted 25 July 2012

Keywords:
Antibiotics
Antibiotic resistance mechanism
Children
Diarrhoeagenic *E. coli*
Commensal *E. coli*

ABSTRACT

Diarrhoeagenic *Escherichia coli* (DEC) are an important cause of diarrhoea in children and are associated with high antibiotic resistance. However, there are few studies on the molecular mechanisms of resistance in this group of bacteria. The aim of this study was to determine the mechanisms associated with antibiotic resistance in the most common phenotypes of DEC. A total of 369 *E. coli* strains [commensal strains and DEC from children with ('DEC-diarrhoea') or without ('DEC-control') diarrhoea] isolated from children aged <1 year in periurban districts of Lima, Peru, were analysed. In total, 154 ampicillin-resistant strains (36 commensals, 33 DEC-control and 85 DEC-diarrhoea) were studied by PCR for the most prevalent resistance mechanisms to ampicillin, trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), tetracycline and chloramphenicol as well as for integrase types 1 and 2. In addition, restriction fragment length polymorphism was performed for SXT-resistant strains. Commensal strains were more frequently resistant to nalidixic acid and ciprofloxacin (68% and 28%, respectively) than DEC strains (23% and 2%, respectively) ($P < 0.05$). DEC-diarrhoea strains were more frequently SXT-resistant (78%) compared with DEC-control strains (65%) and commensal strains (60%) ($P < 0.05$). The most frequent mechanisms of antibiotic resistance in DEC strains were: for β-lactams, bla_{TEM} (31%; 37/118); for SXT, *sul2* (48%; 49/103); for tetracycline, *tetA* (27%; 23/84); and for chloramphenicol, *cat* (80%; 28/35). The genes *sul1* and *dfrA1*, related to SXT resistance, were more frequent in the DEC-diarrhoea group (41% and 28%, respectively) than in the other two groups ($P < 0.05$). There was a high diversity of resistance genes in DEC, including symptomatic strains.
© 2012 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Diarrhoea is one of the leading causes of paediatric morbidity and mortality in developing countries. Every year, diarrhoea is responsible for ca. 1.8 million deaths worldwide [1]. One of the principal aetiological groups of diarrhoea is the diarrhoeagenic *Escherichia coli* (DEC). Based on specific virulence factors and pathogenic mechanisms, DEC are classified into six pathotypes: enterotoxigenic *E. coli* (ETEC); enteropathogenic *E. coli* (EPEC); diffusely adherent *E. coli* (DAEC); Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC); enteroinvasive *E. coli* (EIEC); and enteroaggregative *E. coli* (EAEC) [2]. Both commensal *E. coli* and DEC are often resistant to antibiotics [3,4]. To facilitate appropriate empirical antibiotic selection, it is important to have a knowledge of local antibiotic susceptibility patterns [2].

In Peru, previous studies of DEC and commensal *E. coli* reported high antibiotic resistance to ampicillin, trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), tetracycline, chloramphenicol and nalidixic acid [3,4]. However, molecular mechanisms of antibiotic resistance in DEC are poorly defined in Peru and elsewhere in the developing world. Therefore, the aim of this study was to describe the molecular mechanisms of antibiotic resistance in Peruvian DEC using samples isolated from children <1 year of age.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Commensal *E. coli* and DEC strains were isolated from a previous passive surveillance cohort study of diarrhoea in 1034 infants in Peru followed-up from 2 months to 12 months of age in low

* Corresponding author. Tel.: +51 1 482 3910/0903; fax: +51 1 482 3404.
E-mail addresses: theresa.j.ochoa@uth.tmc.edu, theresa.ochoa@upch.pe (T.J. Ochoa).

0924-8579/$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.07.021

socioeconomic communities in the southern districts of Lima. In this study, control samples were obtained from enrolled infants when they were healthy [5].

A total of 1079 *E. coli* were isolated and characterised by a real-time multiplex PCR to determine DEC pathotypes [5]. This PCR uses primers designed to recognise simultaneously nine genes related to virulence factors of each DEC pathotype. A total of 592 DEC were isolated in this cohort study, comprising 326 related to diarrhoea episodes ('DEC-diarrhoea') and 266 related to control healthy asymptomatic children ('DEC-control'). In addition, 487 commensal *E. coli* strains (strains from healthy children without either diarrhoea or virulence genes associated with DEC pathotypes) were isolated.

2.2. Study design

2.2.1. Bacteria

In total, 369 *E. coli* strains isolated in the cohort study were investigated, comprising 74 commensal, 94 DEC-control and 201 DEC-diarrhoea strains. The DEC group included strains of EPEC, ETEC, EAEC and DAEC pathotypes; STEC and EIEC strains were not included because of their very low prevalence in the same cohort of children [5]. *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as a control.

2.2.2. Phenotypic characterisation of antibiotic resistance

Resistance to 11 antibiotics was determined by disk diffusion following the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. The disks used were ampicillin (10 μg), amoxicillin/clavulanic acid (AMC) (30 μg), cefotaxime (30 μg), ceftazidime (30 μg), trimethoprim/sulfamethoxazole (23.75/1.25 μg), ciprofloxacin (5 μg), chloramphenicol (30 μg), gentamicin (10 μg), nalidixic acid (30 μg), nitrofurantoin (30 μg) and tetracycline (30 μg).

2.2.3. Molecular mechanisms of resistance

Genes encoding common resistance mechanisms to β-lactams, tetracycline, chloramphenicol and SXT as well as integrase types 1 and 2 were studied.

β-Lactam-related genes were studied in 154 strains with high-level resistance to ampicillin. These strains were also evaluated for genes conferring resistance to tetracycline, chloramphenicol and SXT when they were highly resistant.

DNA extraction was performed by the thermal shock lysis technique. Molecular mechanisms of antibiotic resistance and integrase types 1 and 2 detection were performed by conventional PCR using previously described primers (Table 1). PCR was performed for each gene in a 20 μL reaction mixture containing 0.25 mM of each dNTP (Promega, Madison, WI), 4 μL of 5× colourless buffer (GoTaq®; Promega), 2.4 μL of 25 mM $MgCl_2$ (GoTaq®; Promega), 0.5 U of *Taq* polymerase (GoTaq®; Promega) and 2 μL of DNA template. PCR amplification was performed in a thermocycler (iCycler; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) with hybridisation temperatures as specified in Table 1 for each primer. Amplified products were analysed using 1.5% agarose gel electrophoresis and were visualised by staining with ethidium bromide. A 100 bp DNA ladder (Fermentas Inc., Glen Burnie, MD) was used as a molecular marker. For all PCR amplifications, positive control *E. coli* strains from Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona (Barcelona, Spain) were used.

Table 1
Primers and conditions for identification of molecular mechanisms of antibiotic resistance.

Antibiotic/gene	Primer	Primer sequence (5′ → 3′)	Gene	Size (kb)	Hybridisation temperature (°C)	Reference
β-Lactams	TEM-F	ATTCTTGAAGACGAAAGGGC	bla_{TEM}	1150	60	[6]
	TEM-R	ACGCTCAGTGGAACGAAAAC				
	SHV-F	CACTCAAGGATGTATTGTG	bla_{SHV}	885	52	[6]
	SHV-R	TTAGCGTTGCCAGTTATTGTG				
	carb1	AATGGCAATCAGCGCTTC	bla_{CARB}	586	56	[7]
	carb2	GGGGCTTGATGCTCACT				
	OXA-F	ACACAATACATATCAACTTCGC	bla_{OXA}	813	61	[6]
	OXA-R	AGTGTGTTTAGAATGGTGATC				
Tetracycline	tetA up	GTAATTCTGAGCACTGTCGC	*tetA*	937	62	[6]
	tetA low	CTGCCTGGACAACATTGCTT				
	tetB1	CTCAGTATTCCAAGCCTTTG	*tetB*	416	62	[6]
	tetB2	CTAAGCACTTGTCTCCTGTT				
Chloramphenicol	cmlA1	TGTCATTTACGGCATACTCG	*cmlA*	455	55	[6]
	cmlA2	ATCAGGCATCCCATTCCCAT				
	Cat-F	GGTGAGCTGGTGATATGG	*cat*	209	48	[8]
	Cat-R	GGGATTGGCTGAGACGA				
	FloR up	CACGTTGAGCCTCTATAT	*floR*	868	55	[6]
	FloR low	ATGCAGAAGTAGAACGCG				
Sulfamethoxazole	Sul1-F	TGGTGACGGTGTTCGGCATTC	*sul1*	789	63	[6]
	Sul1-R	GCGAAGGTTTCCGAGAAGGTG				
	Sul2-F	CGGCATCGTCAACATAACC	*sul2*	722	50	[6]
	Sul2-R	GTGTGCGGATGAAGTCAG				
Trimethoprim	dfr-1 up	GTGAAACTATCACTAATGG	*dfrA1A, dfrA5, dfrA15, dfrA16*[a]	474	55	[9]
	dfr-1 low	TTAACCCTTTTGCCAGATTT				
	dfr-7 up	TTGAAAATTTCATTGATT	*dfrA7, dfrA17*[a]	474	55	[9]
	dfr-7 low	TTAGCCTTTTTTCCAAATCT				
	dfr-12 up	GGTGGCGCAGAAGATTTTTCGC	*dfrA12, dfrA13*[a]	319	60	[9]
	dfr-12 low	TGGGAAGAAGGCGTCACCCTC				
Integrons	Integrase1-F	GGGTCAAGGATCTGGATTTCG	*intI1*	483	62	[6]
	Integrase1-R	ACATGGGTGTAAATCATCGTC				
	Integrase2-F	CACGGATATGCGACAAAAAGGT	*intI2*	788	62	[6]
	Integrase2-R	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG				

[a] Restriction fragment length polymorphism was performed after PCR [9].

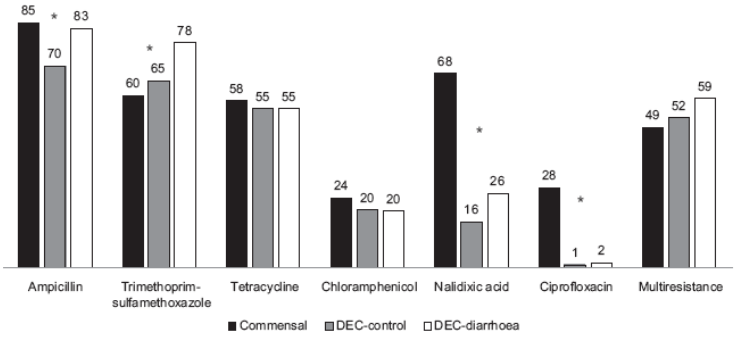


Fig. 1. Percentages of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* ($n = 74$), diarrhoeagenic *E. coli* isolated from asymptomatic children ('DEC-control') ($n = 94$) and diarrhoeagenic *E. coli* isolated from children with diarrhoea ('DEC-diarrhoea') ($n = 201$). *$P < 0.05$ for the comparison between the three groups.

For trimethoprim resistance genes, PCR products were additionally analysed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis as previously described by Navia et al. [9].

3. Results

3.1. Antibiotic resistance phenotypes

Escherichia coli strains ($n = 369$) were commonly resistant to ampicillin (80%), SXT (71%), tetracycline (56%), chloramphenicol (21%) and nalidixic acid (32%). Quinolone (nalidixic acid and ciprofloxacin) resistance was significantly higher in commensal strains than in DEC different strains ($P < 0.05$). EAEC and DAEC tended to present higher resistance levels than EPEC and ETEC for most used antibiotics. Multiresistance was found in 76% of EAEC and 90% of DAEC.

Resistance to ampicillin, SXT and nalidixic acid differed between commensals, DEC-control and DEC-diarrhoea groups ($P < 0.05$). Commensal strains were significantly more likely to be resistant to ampicillin, nalidixic acid and ciprofloxacin than DEC strains (Fig. 1). DEC-diarrhoea strains were significantly more commonly resistant to SXT compared with commensal strains and DEC-control (Fig. 1). Resistance rates for the other antibiotics evaluated were <5%, including resistance to third-generation cephalosporins.

3.2. Antibiotic resistance mechanisms

The most prevalent genes were (Table 2): for β-lactam resistance, bla_{TEM} present in 31% of strains (47/154); for SXT resistance, *dfrA1* present in 18% (23/130) and *sul2* present in 49% (64/130); for tetracycline resistance, *tetA* present in 26% (28/106); and for chloramphenicol resistance, *cat* present in 78% (35/45) of strains. Results were also analysed by group, i.e. commensal *E. coli*, DEC-control and DEC-diarrhoea. All studied molecular mechanisms of resistance present in DEC groups were also present in the commensal group, except for *dfr17* conferring trimethoprim resistance (Table 2). The *sul1* and *dfrA1* genes related to SXT resistance were more frequent in DEC-diarrhoea strains than in commensal and DEC-control groups ($P < 0.05$). Integrase 1 was more frequently found in the DEC-control group than in the other two groups ($P < 0.05$) (Table 2). Neither DEC-diarrhoea nor DEC-control groups were found to have the *cmlA* gene conferring chloramphenicol resistance (Table 2). Compared with the DEC-control group, DEC-diarrhoea strains tended to have higher rates of the majority of

Table 2
Frequency of genes related to antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli*, diarrhoeagenic *E. coli* isolated from asymptomatic children ('DEC-control') and diarrhoeagenic *E. coli* isolated from diarrhoea episodes ('DEC-diarrhoea').

Genes related to antibiotic resistance		*n*/*N* (%)		
		Commensals	DEC-control	DEC-diarrhoea
β-Lactams	bla_{TEM}	10/36 (28)	7/33 (21)	30/85 (35)
	bla_{SHV}	1/36 (3)	1/33 (3)	5/85 (6)
	bla_{CARB}	1/36 (3)	2/33 (6)	0/85 (0)
	bla_{OXA}	3/36 (8)	1/33 (3)	5/85 (6)
SXT	*sul1*[a]	4/27 (15)	3/29 (10)	30/74 (41)
	sul2	15/27 (56)	15/29 (52)	34/74 (46)
	dfrA1[a]	1/27 (4)	1/29 (3)	21/74 (28)
	dfrA7	1/27 (4)	1/29 (3)	5/74 (7)
	dfrA17	0/27 (0)	1/29 (3)	0/74 (0)
	dfrA12	1/27 (4)	2/29 (7)	1/74 (1)
Tetracycline	*tetA*	5/22 (23)	4/23 (17)	19/61 (31)
	tetB	5/22 (23)	1/23 (4)	13/61 (21)
Chloramphenicol	*cat*	7/10 (70)	8/12 (67)	20/23 (87)
	floR	3/10 (30)	1/12 (8)	4/23 (17)
	cmlA	1/10 (10)	0/12 (0)	0/23 (0)
Integrons	*intI1*[a]	3/36 (8)	8/33 (24)	3/85 (4)
	intI2	1/36 (3)	4/33 (12)	5/85 (6)

SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole.
[a] $P < 0.05$ for difference between three groups.

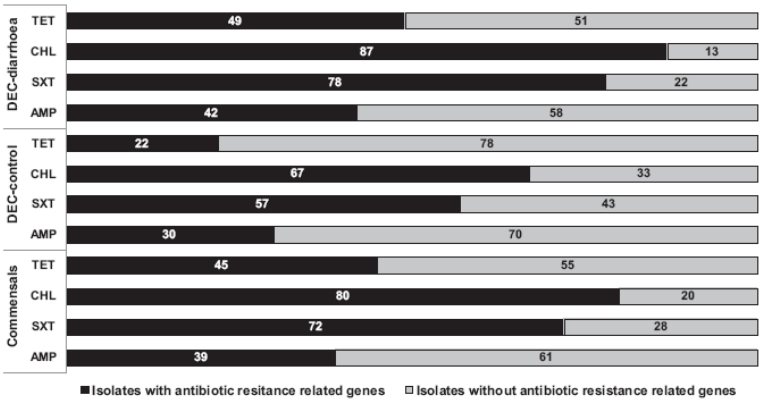


Fig. 2. Presence of antimicrobial resistance-related genes. Percentages of resistant *Escherichia coli* isolates (commensals, DEC-diarrhoea and DEC-control) that present at least one of the analysed genes related to mechanisms of antibiotic resistance for each antibiotic family. 'DEC-control', diarrhoeagenic *E. coli* isolated from asymptomatic children; 'DEC-diarrhoea', diarrhoeagenic *E. coli* isolated from children with diarrhoea; AMP, ampicillin; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; CHL, chloramphenicol; TET, tetracycline.

antibiotic resistance mechanisms, although these differences were not statistically significant (Table 2).

Significant proportions of antibiotic-resistant strains did not exhibit any of the resistance mechanisms tested for. For example, only 39% of ampicillin-resistant strains presented at least one of the β-lactamase genes searched for, and 42% of tetracycline-resistant strains had at least one gene related to mechanisms of tetracycline resistance. For chloramphenicol and SXT, the percentages of strains with at least one of the genes analysed were higher (80% and 72%, respectively) (Fig. 2).

4. Discussion

In this study, we found a high percentage of multiple antibiotic resistance in commensal strains that was probably due to frequent antibiotic use in the subjects. Antibiotics are often used in patients with severe enteritis. For dysenteric and persistent diarrhoea, antibiotic therapy is usually recommended [10]. However, in paediatric diarrhoea the risk–benefit of antibiotic use is not fully defined. Previous studies suggest that commensal strains could be acting as antibiotic resistance reservoirs in the community [11]. In this report, commensal *E. coli* were more resistant to quinolones (nalidixic acid and ciprofloxacin) than DEC, although the use of this family of antibiotics in children in Peru is limited.

The DEC isolates were separated into DEC-control and DEC-diarrhoea. It is likely that these groups would have had different histories of antibiotic exposure, and previous data have shown that DEC-diarrhoea strains are associated with higher resistance rates [5]. However, few significant differences in antibiotic bacterial resistance rates were found in the three groups (including commensal isolates) for all the tested antibiotics, with the exceptions being nalidixic acid, ampicillin and SXT. Resistance to third-generation cephalosporins in commensal *E. coli* and DEC as well as resistance to ciprofloxacin in the DEC group were found to be low in Peru.

A total of 19 mechanisms of resistance and two integrases were searched in this study. The principal mechanisms of resistance found in commensal strains were *cat* (70%), *sul2* (56%) *floR* (30%) and bla_{TEM} (28%). The majority of these mechanisms are related to mobile elements of antibiotic resistance, which would be consistent with antibiotic exposure explaining their high prevalence in the study population [11]. A previous study in *E. coli* strains from healthy children in Spain reported the presence of a variety of β-lactamases in 24 ampicillin-resistant strains, such as bla_{TEM} (83%), bla_{SHV} (2%) and bla_{OXA-30} (2%). For tetracycline, *tetA* (57%), *tetB* (24%) and *tetD* (2%) were reported from 21 resistant isolates [12].

The high percentage of resistance to SXT correlates with the high prevalence of genes of antibiotic resistance to both antibiotics in the DEC-diarrhoea group. High levels of resistance to this combined antibiotic in commensal *E. coli* and DEC have been reported previously [13]. One given explanation was their widespread use in the treatment of diseases associated with Gram-negative bacteria, especially in children under 2 years of age with acute infectious diarrhoea [13].

In conclusion, the present study describes for the first time a comprehensive assessment of molecular mechanisms of antibiotic resistance in DEC isolated from children with diarrhoea and from healthy controls in a large number of strains. We were unable to detect the antibiotic resistance mechanisms in all of the strains analysed, especially for ampicillin- and tetracycline-resistant strains; among the principal mechanisms of resistance reported in *E. coli* that we did not search for are the different families of Gram-negative efflux pumps directly related to high multidrug resistance [14]. However, the fact that a large number of antibiotic resistance genes were found, highlights the importance of persistant surveillance studies, especially in developing areas such as Peru where the most commonly used antibiotics in children and adults [15] are available without prescription.

Funding: This study was partially supported by the Agencia Española de Cooperación Internacional (AECID), Spain, Programa de Cooperación Interuniversitaria e Investigación Científica con Iberoamérica (D/019499/08, D/024648/09 and D/030509/10) (TJO and JR). TJO is supported by the US National Institutes of Health Public Health Service award RO1-HD067694-01A1. JR is supported by 'Miguel Servet' ISCIII (CP05/0130).

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Ethical approval was given by the Institutional Ethics Committee of Universidad Peruana Cayetano Heredia (Lima, Peru) (project no. 57758).

References

[1] Boschi-Pinto C, Velebit L, Shibuya K. Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. Bull World Health Organ 2008;86:710–7.
[2] Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998;11:142–201.
[3] Ochoa TJ, Ruiz J, Molina M, Del Valle LJ, Vargas M, Gil AI, et al. High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* in infants in Peru. Am J Trop Med Hyg 2009;81:296–301.

[4] Bartoloni A, Pallecchi L, Fiorelli C, Di Maggio T, Fernandez C, Villagran AL, et al. Increasing resistance in commensal *Escherichia coli*, Bolivia and Peru. Emerg Infect Dis 2008;14:338–40.
[5] Ochoa TJ, Ecker L, Barletta F, Mispireta ML, Gil AI, Contreras C, et al. Age-related susceptibility to infection with diarrheagenic *Escherichia coli* among infants from periurban areas in Lima, Peru. Clin Infect Dis 2009;49: 1694–702.
[6] Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, et al. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. Antimicrob Agents Chemother 2004;48: 3996–4001.
[7] Arlet G, Philippon A. Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable β-lactamases (TEM, SHV CARB). FEMS Microbiol Lett 1991;66:19–25 [corrected].
[8] Sunde M, Norstrom M. The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. J Antimicrob Chemother 2006;58:741–7.
[9] Navia MM, Ruiz J, Sanchez-Cespedes J, Vila J. Detection of dihydrofolate reductase genes by PCR and RFLP. Diagn Microbiol Infect Dis 2003;46:295–8.
[10] Pickering LK. Antimicrobial resistance among enteric pathogens. Semin Pediatr Infect Dis 2004;15:71–7.
[11] Bailey JK, Pinyon JL, Anantham S, Hall RM. Commensal *Escherichia coli* of healthy humans: a reservoir for antibiotic-resistance determinants. J Med Microbiol 2010;59:1331–9.
[12] Domínguez E, Zarazaga M, Sáenz Y, Briñas L, Torres C. Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from healthy children in Spain. Microb Drug Resist 2002;8:321–7.
[13] Garcia PG, Silva VL, Diniz CG. Occurrence and antimicrobial drug susceptibility patterns of commensal and diarrheagenic *Escherichia coli* in fecal microbiota from children with and without acute diarrhea. J Microbiol 2011;49:46–52.
[14] Nikaido H. Antibiotic resistance caused by Gram-negative multidrug efflux pumps. Clin Infect Dis 1998;27(Suppl. 1):S32–41.
[15] Wirtz VJ, Dreser A, Gonzales R. Trends in antibiotic utilization in eight Latin American countries, 1997–2007. Rev Panam Salud Publica 2007;27:219–25.

ARTICLE 2

Levels of quinolones resistance and other antimicrobial in non-pathogenic Escherichia coli strains in children from the periurban area of Lima, Peru

Nivells de resistència a quinolones i altres antimicrobians en soques d'*Escherichia coli* aïllades en infants de la zona periurbana de Lima, Perú

Pons MJ, Mosquito S, Ochoa TJ, Vargas M, Molina M, Lluque A, Gil AI, Ecker L, Barletta F, Lanata CF, Del Valle LJ, Ruiz J.

Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. 2012 Mar;29(1):82-6

RESUM

La presència de microorganismes comensals resistents a antimicrobians pot ser deguda a la pressió directa del propi consum d'antimicrobians a la comunitat o pot ser, de manera alternativa, que es degui a l'adquisició de microorganismes resistents.

Escherichia coli forma part de manera normal de la microbiota intestinal dels humans, i per això, l'anàlisi dels nivells de resistència a antimicrobians en soques d'*E coli* comensals es considera un model vàlid per estimar l'impacta de l'ús general d'antimicrobians en una àrea específica i una bona aproximació per predir l'evolució de la resistència a la comunitat.

L'objectiu del present treball fou establir els nivells de resistència als principals agents antimicrobians, en 222 d'*E. coli* no patògeniques, d'origen fecal aïllades en nens menors d'un any de Lima, Perú.

La proporció de la resistència trobada als antimicrobians avaluats fou: ampicil·lina (62,6%), cotrimoxazole (48,6%), tetraciclina (43,0%) i cloramfenicol (15,8%). Fem èmfasi als alts nivells de resistència trobats a quinolones: 32% per l'àcid nalidíxic i 12% per ciprofloxacina. La presència de microorganismes multiresistents fou important, trobant-se 91 aïllats amb resistència front 3 o mes antibiòtics no emparendats entre si (91/222, 41,0%).

Com a conclusió, destacar els elevats nivells de resistència als antimicrobians en general, en aquestes soques comensals. Destacar la resistència a quinolones en soques no patogèniques en aquest grup d'edat, on tot i haver demostrat que l'ús és segur en nens, s'utilitzen en casos molt excepcionals. Aquest fet posa de manifest l'ampli ús i l'impacte del consum d'aquest tipus d'antimicrobians en la comunitat, mostrant el risc potencial de la pèrdua de la seva utilitat a la zona.

NIVELES DE RESISTENCIA A QUINOLONAS Y OTROS ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE *Escherichia coli* COMENSALES EN NIÑOS DE LA ZONA PERIURBANA DE LIMA, PERÚ

María J. Pons[1,a], Susan Mosquito[2,b], Theresa J. Ochoa[2,3,c], Martha Vargas[4,d], Margarita Molina[5,e], Angela Lluque[2,b], Ana I. Gil[5,e], Lucie Ecker[5,f], Francesca Barletta[2,g], Claudio F. Lanata[5,6,f], Luis J. Del Valle[7,d], Joaquim Ruiz[1,8,d]

RESUMEN

El objetivo principal del estudio fue establecer el nivel de resistencia a antimicrobianos en un total de 222 cepas comensales de *E. coli* de origen fecal, en Perú. Las frecuencias de resistencia encontrados, frente los antimicrobianos evaluados, fueron: ampicilina (62,6%), cotrimoxazol (48,6%), tetraciclina (43,0%) y cloranfenicol (15,8%). Destacan los elevados niveles de resistencia a quinolonas: 32% al ácido nalidíxico (NAL) y 12% a ciprofloxacino (CIP). Estos elevados niveles hacia las quinolonas en cepas comensales aisladas en niños de esta franja de edad, realzan el uso extendido y el impacto de consumo de este tipo de antimicrobianos en la comunidad, mostrando el riesgo potencial de su pérdida de utilidad en el área.

Palabras clave: *Pruebas de sensibilidad microbiana; Quinolonas; Escherichia coli; Bacterias fecales (fuente: DeCS BIREME).*

LEVELS OF QUINOLONES RESISTANCE AND OTHER ANTIMICROBIAL IN NON-PATHOGENIC *Escherichia coli* STRAINS IN CHILDREN FROM THE PERIURBAN AREA OF LIMA, PERU

ABSTRACT

The main aim of this study was to establish the resistance levels to antimicrobial agents, in 222 non-pathogenic E. Coli strains of fecal origin in Peru. The proportion of resistance found to the evaluated antimicrobials was ampicillin (62.6%), cotrimoxazole (48,6%), tetracycline (43,0%) and chloramphenicol (15,8%). We emphasize the high resistance levels found for quinolones: 32% for nalidixic acid (NAL) and 12% for ciprofloxacin (CIP). These high levels of quinolone-resistance in non-pathogenic strains isolated from children in this age group highlight the extensive use and the impact of the intake of this kind of antimicrobials in the community, showing the potential risk of the loss of their utility in the area.

Key words: *Microbial sensitivity tests; Quinolones; Escherichia coli; Fecal bacteria (source: MeSH NLM).*

INTRODUCCIÓN

Desde la introducción de la penicilina en la práctica clínica, en la década de 1940, los antimicrobianos han sido usados para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Desafortunadamente las bacterias han desarrollado resistencia a todos los antimicrobianos conocidos hasta el momento. Actualmente la resistencia a antimicrobianos, sobre todo la presencia de multirresistencia, es considerada uno de los problemas de salud de mayor relevancia a nivel mundial según la OMS [(1)].

Las quinolonas son una familia de antimicrobianos que

[1] Barcelona Centre fot International Health Researh (CRESIB, Hospital Clinic-Universitat de Barcelona). Barcelona, España.
[2] Instituto de Medicina Tropical, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú.
[3] University of Texas School of Public Health. Houston, EE.UU.
[4] Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic. Barcelona, España.
[5] Instituto de Investigación Nutricional. Lima, Perú
[6] Escuela de Medicina, Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas. Lima, Perú.
[7] Departament d'Enginyeria Química, ETSEIB, Universitat Politècnica de Catalunya. Barcelona, España.
[8] CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Barcelona, España.
[a] Bióloga, magister en biomedicina; [b] bióloga, magister en Microbiología; [c] médico, pediatra infectólogo; [d] biólogo, posdoctorado en biología; [e] microbióloga; [f] médico epidemiólogo; [g] bióloga molecular

Recibido: 03-11-11 Aprobado: 22-02-12

fueron introducidos a la práctica clínica en 1967. Desde ese momento, debido a su amplio espectro de actividad, su uso se extendió rápidamente siendo actualmente uno de los antimicrobianos más prescritos a nivel mundial [2].

Clásicamente estos antimicrobianos no han sido usados para tratar infecciones en niños, pero en informes recientes se muestra su seguridad en este grupo de edad [3]. El mecanismo de resistencia más relevante frente a las quinolonas es la presencia de substituciones específicas en las dianas [2], aunque, en los últimos 10 años se han descrito varios mecanismos transferibles de resistencia a quinolonas [4].

La presencia de microorganismos comensales resistentes a antimicrobianos puede deberse a la presión directa del propio consumo de antimicrobianos o puede que, de manera alternativa, se deba a la adquisición de microorganismos resistentes. La *Escherichia coli* es un miembro típico de la microbiota intestinal, tanto en humanos como en animales [5]. Por ello, el análisis de los niveles de resistencia a antimicrobianos en cepas de *E. coli* comensales es un modelo válido para estimar el impacto del uso general de antimicrobianos en una área específica y una aproximación adecuada para predecir la evolución de la resistencia a quinolonas en la comunidad.

El objetivo del presente trabajo es analizar los niveles de resistencia a antimicrobianos en *E. coli* comensales aislados de niños peruanos de hasta doce meses.

EL ESTUDIO

Se realizó un estudio transversal de vigilancia de la diarrea infantil, donde se incluyeron muestras fecales recogidas entre octubre de 2006 y noviembre de 2007 de niños con diarrea (≥ 3 deposiciones líquidas o semilíquidas en menos de 24 h o ≥ 1 deposición con sangre) y controles (niños sanos que no hubiesen presentado diarrea una semana antes y una después de la recogida de la muestra) de 2 a 12 meses de edad [6].

Para este subestudio de sensibilidad antimicrobiana, se utilizó las muestras de los niños sanos. Entraron en este grupo un total de 560 niños entre los 2 a 12 meses de edad, de los cuales se obtuvieron muestras fecales cada mes [6].

De cada muestra de heces sembrada en medio Mc Conkey, se recuperaron cinco colonias lactosa positivas susceptibles de ser *E. coli*. Las colonias fueron identificadas por métodos bioquímicos convencionales y se descartó la presencia de *E. coli* diarrogénicas empleando *real time* PCR descrita en un estudio previo [6], se seleccionó así las *E.coli* comensales. De todas aquellas muestras con *E. coli* comensales, se seleccionaron 222 cepas provenientes de 222 niños analizados en este estudio.

Se estableció la sensibilidad a ampicilina (AMP), amoxicilina más ácido clavulánico (AMC), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), gentamicina (GEN), ácido nalidixico (NAL), ciprofloxacino (CIP), tetraciclina (TET), cloranfenicol (CHL), cotrimoxazol (SXT) y nitrofurantoina (NIT) mediante la técnica de difusión en disco, según la guía del *Clinical and Laboratory and Standards Institute* (CLSI) [7]. También se estableció la sensibilidad a azitromicina en 207 aislados usando la misma técnica.

La multirresistencia se definió como presencia de resistencia a tres o más agentes antimicrobianos no relacionados entre sí, excluyendo el caso de la azitromicina, debido a la falta de puntos de corte para *Enterobacteriaceae* [7]. Es por este mismo motivo por lo que la azitromicina se excluyó para las determinaciones de los perfiles de resistencia.

Se establecieron dos grupos para un mejor análisis de los resultados, un primer grupo con niños de edades comprendidas entre 0 y 6 meses y un segundo de mayores de 6 a 12 meses. Se usó la prueba de Fisher para el análisis estadístico de los resultados.

Se establecieron los diferentes fenotipos de sensibilidad a quinolonas, usando los puntos de corte recomendados por el CLSI, concretamente para NAL es resistente ≤ 13 mm, intermedia 14-18, sensible ≥ 19 mm y para CIP resistente ≤ 15 mm, intermedia 16-18, sensible ≥ 21 mm.

Se describen los datos con frecuencias y porcentajes, procesados en una hoja de cálculo en Excel 2010.

Los niños escogidos entraron en el estudio después de que su responsable firmara el consentimiento informado. El estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Investigación Nutricional y de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

HALLAZGOS

En los resultados de sensibilidad obtenidos (Tabla 1), se observaron elevados niveles de resistencia a AMP (62,6%), SXT (48,6%) y TET (43,0%), mientras que la resistencia fue menos elevada a CHL (15,8%) y GEN (10.4%). Los niveles al resto de antimicrobianos testados fue menor al 10%.

Tabla 1. Niveles de resistencia a antimicrobianos en *E. coli* comensales, aislados de muestras fecales de niños sanos de Perú.

	Total de muestras (N=222)			Niños 0-6 meses (N=99)			Niños 7-12 meses (N=123)		
A.A	S	I	R	S	I	R	S	I	R
AMP	80 (36,0)	3 (1,3)	139 (62,6)	36 (36,4)	1 (1,0)	62 (62,6)	44 (35,8)	2 (1,6)	77 (62,6)
SXT	114 (51,4)	--	108 (48,6)	60 (60,6)	--	39 (39,4)	54 (43,9)	--	69 (56,1)†
TET	123 (55,4)	4 (1,8)	95 (42,8)	60 (61,6)	2 (2,0)	37 (37,4)	63 (51,2)	2 (1,6)	58 (47,1)
NAL	146 (65,8)	5 (2,2)	71 (32,0)	69 (69,7)	1 (1,0)	29 (29,3)	77 (62,7)	4 (3,3)	42 (34,1)
CIP	193 (86,9)	2 (0,9)	27 (12,1)	87 (87,9)	1 (1,0)	11 (11,1)	106 (86,2)	1 (0,8)	16 (13,0)
CHL	187 (84,2)	--	35 (15,8)	84 (84,8)	--	15 (15,2)	103 (83,7)	--	20 (16,3)
GEN	197 (88,7)	2 (0,9)	23 (10,3)	91 (91,9)	1 (1,0)	7 (7,1)	106 (86,2)	1 (0,8)	16 (13,0)
NIT	200 (90,1)	7 (3,2)	12 (5,4)	87 (86,9)	7 (7,1)	5 (5,0)	116 (94,3)	--	7 (5,7)
AMC	189 (85,1)	23 (10,4)	10 (4,5)	85 (85,9)	10 (10,1)	4 (4,0)	104 (84,5)	13 (10,6)	6 (4,9)
CTX	212 (95,5)	7 (3,2)	3 (1,4)	96 (97,0)	2 (2,0)	1 (1,0)	116 (94,3)	5 (4,1)	2 (1,6)
CAZ*	216 (97,7)	3 (1,3)	2 (0,9)	97 (98,0)	2 (2,0)	--	119 (97,6)	1 (0,8)	2 (1,6)

AMP: ampicilina; SXT: cotrimoxazol; TET: tetraciclina; NAL: ác. nalidíxico; CIP: ciprofloxacino; CHL: cloranfenicol; GEN: gentamicina; NIT: nitrofurantoina; AMC:amoxicilina más ácido clavulánico; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; A.A: agente antimicrobiano.
S: sensible; I: intermedio; R: resistente
*Datos de 221 aislados. † p<0,05 por la comparación entre niños 0-6 meses y niños 7-12 meses de edad.

Al realizar el análisis por edad, se observó que los niveles de resistencia a SXT eran significativamente mayores en el grupo de niños mayores de 6 a 12 meses, comparado con el grupo de menor edad (p<0,05).

En el caso de la azitromicina se agrupó por el tamaño del diámetro de inhibición. En trece aislados (6,3%) no se observó halo, mientras que en diez (5,3%) y cuarentidós (20,3%) aislados mostraban halo menor de 10 mm o comprendido entre 11 a 15 mm respectivamente. El resto de aislados analizados comprendían diámetros entre 16 y 20 mm (61/207, 28%) o mayor que 20 mm (90/207, 41,3%).

Cabe destacar los elevados niveles de resistencia a NAL (32,0%), así como, en menor número, a CIP (12,2%). La presencia de resistencia a NAL pero sensibilidad o resistencia intermedia a CIP fue detectada en cuarentidós (18,9%) y dos (0,9%) cepas respectivamente. Se encontraron cinco (2,3%) aislados que presentaban resistencia intermedia a NAL. No se encontró ningún aislado que presentara resistencia a CIP y fuese sensible o con resistencia intermedia a NAL (Tabla 2).

Tabla 2. Fenotipos de resistencia a quinolonas encontrado en las cepas comensales.

	Aislados	
Fenotipo	**N.°**	**%**
Nal^S Cip^S	146	65,8
Nal^I Cip^S	5	2,2
Nal^R Cip^S	42	18,9
Nal^R Cip^I	2	0,9
Nal^R Cip^R	27	12,2
TOTAL	222	100,0

Nal: ácido nalidíxico, Cip: ciprofloxacino
En superíndice, R: resistente, I: resistencia intermedia, S: sensible.

Se detectó multirresistencia en noventiún aislados (91/222, 41,0%). Además, se encontraron cepas que presentaban resistencia intermedia a diferentes antimicrobianos. De estos aislados, la mayoría exhibían resistencia intermedia a AMC.

Se observaron un total de 81 perfiles de resistencia, los encontrados con mayor frecuencia fueron los "pansusceptible" (sensibles a todos los antimicrobianos evaluados; Tabla 3). El resto de perfiles de resistencia encontrados tenían menos de diez aislados cada uno (<5% de todos los aislados).

Tabla 3. Perfiles principales de sensibilidad a antimicrobianos.

Perfiles	**N.°***	**%**
Sensible a todos A.A	49	22
AMP^R SXT^R TET^R	16	7,2
AMP^R	14	6,3
AMP^R SXT^R	13	5,9
AMP^R SXT^R TET^R NAL^R	13	5,9
Otros[1]	117	52,7

* Número de cepas aisladas.
[1] Setenta y seis perfiles de sensibilidad que presentaban porcentajes menores de 5% entre todos los aislados.
A.A: agente antimicrobiano; AMP: ampicilina; SXT: cotrimoxazol; TET: tetraciclina; NAL: ác. nalidíxico.
S: sensible; I: intermedio; R: resistente

DISCUSIÓN

El uso de las quinolonas, a pesar de demostrarse su seguridad en niños [3], se limita a situaciones y usos específicos, en Perú no es una excepción. De este hecho, y debido a la falta de datos de consumo de antimicrobianos, se infiere que los elevados niveles de resistencia a quinolonas, descritos en las cepas de este estudio, no son por la presión directa después de un tratamiento, sino a razones externas.

En un estudio reciente, realizado en una comunidad alejada de la Amazonía peruana, donde el uso de antimicrobianos es limitado, no se encontraron microorganismos aislados de *E. coli* resistentes a quinolonas, ni en niños ni en adultos [8]. Este hecho sugiere que la resistencia a quinolonas, descrita en el presente estudio, se debería a la fuerte influencia de la exposición a los antimicrobianos de manera persistente. Así, la resistencia a quinolonas se podría considerar como un buen marcador de la exposición a los antimicrobianos.

Los presentes resultados sugieren un gran uso de estos antimicrobianos en la comunidad. Este hecho podría haber originado la selección de aislados resistentes a quinolonas, los cuales habrían sido adquiridos por los niños e incorporados como parte de su microbiota intestinal comensal. Por tanto, probablemente las *E. coli* comensales resistentes a quinolonas observadas, fueron adquiridas directamente del entorno familiar. Existen estudios previos en otra zona periurbana de Lima que muestran aislados de *E. coli* de adultos voluntarios sanos, que presentaban niveles de resistencia a ciprofloxacino superiores al 30% [9]. Además, actualmente se puede comprar antimicrobianos sin prescripción, de donde se puede derivar con facilidad a tratamientos y posologías incorrectas, siendo ambos factores favorecedores para la aparición y selección de resistencias a antimicrobianos. Por último, debemos señalar los elevados niveles de resistencia a quinolonas que se han detectado en microorganismos procedentes de piscifactorías [10]. Estos datos reflejan los elevados niveles de uso de las quinolonas y sugieren un rol relevante de la cadena alimentaria en la diseminación de la resistencia en el área.

El uso inapropiado de estos antimicrobianos y la aparición de resistencias, no está limitado a microorganismos comensales sino que también es extensible a microorganismos patogénicos, resultando en una pérdida de su potencial para tratar distintas infecciones. Dando soporte a estas afirmaciones, se han descrito altos niveles de resistencia a quinolonas en *E. coli* diaerrogénicas en la misma área [11,12].

Es necesario destacar los elevados niveles de resistencia encontrados en estas cepas comensales y así como en diaerrogénicas de la misma cohorte [12], frente a otros antimicrobianos de uso frecuente en pediatría, como son AMP, SXT, entre otros, lo cual sugiere la necesidad urgente de búsqueda de tratamientos alternativos eficaces. Por el momento otros antimicrobianos, como el caso de la azitromicina, se han añadido a la lista para tratar la diarrea. Desafortunadamente, el presente estudio también muestra aislados resistentes a AZM en la zona.

Estos datos elevados de resistencias a antimicrobianos se podrían relacionar con datos de un estudio realizado en ocho países de América Latina, en el que se describe la evolución del consumo de antimicrobianos en la población, entre 1997 y 2007, donde se observa a Perú como uno de los países donde se había incrementado el consumo de antimicrobianos [13].

En el resto de antimicrobianos analizados, no pertenecientes al grupo de las quinolonas, la resistencia sería atribuible a presión directa a la que están sometidas las *E. coli* comensales. Los niveles significativamente más elevados de resistencia a SXT en niños entre 7 y 12 meses apoya esta posibilidad, dado que este es uno de los antimicrobianos más extensamente usados para tratar infecciones infantiles. Sin embargo, los mecanismos de resistencia más frecuentemente descritos frente a estos antimicrobianos están localizados en elementos móviles [14] y, por tanto, no se debe descartar un origen exógeno de la adquisición de mecanismos moleculares de resistencia.

Previos informes nos muestran cierto grado de clonalidad en cepas de *E.coli* comensales, realizados en pequeñas comunidades aisladas. A pesar de que los perfiles de resistencia a antimicrobianos no son un buen marcador de las relaciones clonales, la elevada variedad de perfiles encontrados podrían reflejar el bajo grado de clonalidad de las cepas de *E. coli* comensales estudiadas. Una heterogeneidad de perfiles de resistencia similar han sido informados previamente en otros estudios de cepas no patogénicas de dicha bacteria [14,15].

Al ser este estudio de una región limitada de Lima, podría ser que estos datos no fueran representativos de otras regiones del país.

Como conclusión, este informe muestra los altos niveles de resistencia a antimicrobianos, especialmente en quinolonas en niños menores de 1 año, en Lima. Estos datos pueden sugerir un elevado consumo de antimicrobianos en la comunidad, así como nos muestran el riesgo inminente de pérdida de eficiencia

de las quinolonas para tratar enfermedades diarreicas u otras infecciones, se propone la necesidad de buscar nuevas alternativas de tratamiento.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Laura Puyol por su apoyo en la logística del laboratorio.

Contribuciones de autoría

AIG, CFL, SM, JR participaron en la concepción y diseño del estudio; AIG, CFL, MM, TJO y JR en el aporte de pacientes o material de estudio; CFL, TJO y JR en la obtención del financiamiento; TJO, SM, MJP, JR, y LJdV participaron el análisis e interpretación de los datos. Todos los autores participaron de la recolección de resultados, revisión crítica del manuscrito, aprobación de su versión final.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Fuentes de financiamiento

Este trabajo fue parcialmente financiado por *Agència Catalana de Cooperació al Desenvolupament* proyecto U2006 (LJdV), *Centre de Cooperació per al Desenvolupament - Universitat Politècnica de Catalunya* (LJdV), Agencia Española de Cooperación Internacional al Desarrollo proyectos numero A/4892/06 (LJdV), D/019499/08 y D/024648/09 (JR), *Fogarty International Center, National Institute of Health*, USA, proyecto 1K01TW007405 (TJO) Sanofi Pasteur y fondos de investigación del Dr. Lanata, Instituto de Investigación Nutricional, Lima, Perú. La investigación de JR es financiado por el proyecto CP05/0130 del FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias, España).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. Ginebra: OMS; 2001.
2. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. J Antimicrob Chemother. 2003;51(5):1109-17.
3. Murray TS, Baltimore RS. Pediatric uses of fluoroquinolone antibiotics. Pediatric Ann. 2007;36(6):336-42.
4. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. Clin Microbiol Rev. 2009;22(4):664-89.
5. Tannock GW. Normal microflora. An introduction to microbes inhabiting the human body. London: Ed-Chapman and Hall; 1995.
6. Ochoa TJ, Ecker L, Barletta F, Mispireta ML, Gil AI, Contreras C, et al. Age-related susceptibility to infection with diarrheagenic *Escherichia coli* among Infants from Periurban Areas in Lima, Peru. Clin Infect Dis. 2009;49(11):1694-702.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifteenth informational supplement. Wayne, PA: CLSI; 2005.
8. Bartoloni A, Pallecchi L, Rodriguez H, Fernandez C, Mantella A, Bartalesi F, et al. Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community. Internat J Antimicrob agents. 2009;33(2):125-9.
9. Nys S, Okeke IN, Kariuki S, Dinant GJ, Driessen C, Stobberingh EE. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* from healthy volunteers from eight developing countries. J Antimicrob Chemother. 2004;54(5):952-5.
10. Deza J, Sierralta V, León J, Mateo E. Sensibilidad antibiótica in vitro de Yersinia ruckeri aisladas de Oncorhynchus "trucha arcoiris" de piscigranja del centro del Perú. XVIII Reunión Científica del ICBAR. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas. Lima, Perú. 2009.
11. Fàbrega A, Sánchez-Céspedes J, Soto S, Vila J. Quinolone resistance in the food chain. Int J Antimicrob Agents. 2008;31(4):307-15.
12. Ochoa TJ, Ruiz J, Molina M, Del Valle LJ, Vargas M, Gil AI, et al. High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* in infants in Peru. Am J Trop Med Hyg. 2009;81(2):296-301.
13. Wirtz VJ, Dreser A, Gonzales R. Trends in antibiotic utilization in eight Latin American countries, 1997-2007. Rev Panam Salud Publica. 2010;27(3):219-25.
14. Pallecchi L, Lucchetti C, Bartoloni A, Bartalesi F, Mantella A, Gamboa H, et al. Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from remote community with minimal antibiotic exposure. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(4):1179-84.
15. Domínguez E, Zarazaga M, Sáenz Y, Briñas L, Torres C. Mechanisms of antibiotic resistance in *escherichia coli* isolates obtained from healthy children in Spain. Microb Drug Resist. 2002;8(4):321-7.

Correspondencia: *Joaquim Ruiz*
Dirección: Ed. CEK, pl1, C/ Rosselló 153, 08036, Barcelona, España.
Teléfono: (34) 932275400 ext 4547, fax: (34) 932279853
Correo electrónico: joruiz@clinic.ub.es

ARTICLE 3

Analysis of quinolone-resistance in commensal and diarrheagenic *Echerichia coli* isolates from infants in Lima, Peru

Analisis de la resistència a quinolones en *Escherichia coli* comensals i diarreogèniques aïllats en infants de Lima, Perú

Pons MJ, Mosquito S, Gomes C, Del Valle LJ, Ochoa TJ, Ruiz J.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2014 Jan;108(1):22-8. doi: 10.1093/trstmh/trt106. Epub 2013 Dec 3.

RESUM

La resistència a antibiòtics és un problema creixent, especialment en els països on l'ús d'antibiòtics no està sovint controlada.

L'objectiu d'aquest estudi va ser analitzar la prevalença dels mecanismes moleculars de resistència a quinolones en soques d'*E. coli* aïllades de femtes de nens amb diarrea o sense. S'estudià la presència de mutacions en la diana de les quinolones, gen *gyrA* i *parC*, els principals mecanismes transferibles i el rol de bombes d'expulsió que s'inhibeixen per Phe-Arg-β-Naphtylamyde, en un total de 96 soques, 46 *E. coli* diarreogèniques (DEC) i 50 *E. coli* no diarreogèniques (no-DEC). Totes les soques seleccionades presentaven un fenotip de resistència o sensibilitat disminuïda a les quinolones.

En general, el patró més observat va ser $Nal^{R}Cip^{S}$ 64/96 (67%), seguit per $Nal^{R}Cip^{R}$

24/96 (25%) i, finalment, $Nal^{I}Cip^{S}$ 7/96 (7%). Entre el grup DEC el fenotip més freqüent va ser $Nal^{R}Cip^{S}$ 39 (78%), seguit per $Nal^{I}Cip^{S}$ 7 (14%). Mentrestant, els fenotips $Nal^{R}Cip^{S}$ (24/46, 52%) i $Nal^{R}Cip^{R}$ (20/46, 43%), van ser els més freqüents en el grup no-DEC. El fenotip més resistent, Nal^{R} i CIP^{R}, sorprenentment va ser trobat de manera més freqüent en soques aïllades de nens sans. Quan es va observar la distribució dels mecanismes de resistència a quinolones en els diferents grups, DEC i no-DEC, no es va observar cap distribució diferencial, tot i que el gen *aac(6')Ib-cr* es va detectar en major nombre en les soques DEC: 17 (34%) comparat amb les no-DEC (20%). En menor freqüència es va trobar el gen *qnrB*, present en 5 (10%) vs 3 (6%) en el grup DEC i no-DEC respectivament. Els resultats mostren l'important paper de les bombes d'expulsió en adquisició de resistència a quinolones. Es va observar una reducció de com a mínim 2 dilucions en la CMI_{50}, quan es va afegir l'inhibidor de bombes al medi.

Així es pot concloure que les mutacions puntuals en els gens *gyrA* i *parC* juguen un paper rellevant en l'adquisició de la resistència a quinolones en aquesta comunitat i ressaltar, també, el paper importnat que juguen les bombes d'expulsió.

Aquest estudi aporta coneixements sobre els mecanismes moleculars implicats en la resistència a quinolones en aïllaments en una població no exposada a pressió alta antibiòtic comunitat .

Trans R Soc Trop Med Hyg 2014; **108**: 22–28
doi:10.1093/trstmh/trt106 Advance Access publication 3 December 2013

ORIGINAL ARTICLE

Analysis of quinolone-resistance in commensal and diarrheagenic *Escherichia coli* isolates from infants in Lima, Peru

Maria J. Pons[a], S. Mosquito[b], C. Gomes[a], L.J. del Valle[c], T.J. Ochoa[b] and J. Ruiz[a,*]

[a]*Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB-Hospital Clínic-Universitat de Barcelona) Ed. CEK, pl1, C/ Rosselló 153, 08036 Barcelona, Spain;* [b]*Instituto de Medicina Tropical, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú;* [c]*Departament d'Enginyeria Química, ETSEIB, Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, Spain*

*Corresponding author: Tel: +34932275400 ext 4547; Fax: +34932279853; E-mail: joruiz@clinic.ub.es

Received 10 July 2013; revised 17 September 2013; accepted 11 November 2013

Background: Antibiotic resistance is an increasing problem, particularly in countries where antibiotic use is frequently not controlled. The aim of this study was to analyse the prevalence of the molecular mechanisms of quinolone-resistance in *E. coli* isolated from faeces of healthy Peruvian children or those presenting diarrhoea.

Methods: The presence of target mutations, transferable quinolone-resistance mechanisms and the role of Phe-Arg-β-Naphtylamyde inhibitible efflux pumps were studied in 96 *Escherichia coli* (46 diarrheogenic and 50 non-diarrheogenic) isolates exhibiting resistance or diminished susceptibility to quinolones.

Results: The most resistant phenotype, Nal^R and Cip^R, was most frequently present in isolates of healthy children. The distribution of quinolone resistance mechanisms between diarrheogenic (DEC) and commensal (non DEC) isolates was equitable, although the *aac(6')Ib-cr* gene was mainly detected in DEC isolates: 17 (34%) vs non DEC isolates nine (20%). QnrB was present in five (10%) DEC vs three (6%) non DEC isolates.

Conclusions: Point mutations in *gyrA* and *parC* genes play a relevant role in quinolone resistance acquisition and highlight the role of efflux pumps also. This study provides knowledge about the molecular mechanisms involved in quinolone resistance in isolates in a non exposed population under high community antibiotic pressure.

Keywords: Antibiotic resistance, Children, Commensal, Developing countries, Diarrheogenic *Escherichia coli*, Quinolones

Introduction

Although antibiotic resistance is an increasing problem in both developed and developing countries,[1] economical constrictions in the latter result both in empirical use of antimicrobial agents that are usually older, cheaper and sometimes unnecessary, and a lack of antibiotic alternatives resulting in high levels of antimicrobial resistance exhibited by microorganisms against the most common antibacterial agents.[1] In some middle-income countries the situation has a series of particularities that lead to a unique scenario: antibiotic use is frequently not controlled either at human or animal levels and the antibiotics in use include not only those which are cheaper but also those more expensive. The social pressure on physicians is relatively high to obtain antibiotic prescriptions, and diagnostic resources are not always available.[2–4] All of the above may result in the selection and development of antibiotic resistance not only to antibiotics such as ampicillin or cotrimoxazole, but also to the most modern fluoroquinolones or cephalosporins.[5–7]

Quinolone resistance has traditionally been related to chromosomal mutations in drug target genes, *gyrA* and *gyrB* (encoding DNA Gyrase), *parC* and *parE* (encoding Topoisomerase IV), and overexpression of efflux pumps or decreased expression of outer membrane porins.[8] Of these, amino acid substitutions at GyrA and ParC are by far the most important mechanisms of quinolone resistance in clinical isolates.[8]

Although transferable mechanisms of quinolone resistance (TMQR) only confer a moderate reduction of quinolone susceptibility, they are increasingly being identified worldwide, mainly in Gram-negative microorganisms, especially among *Enterobacteriaceae*. Nonetheless, TMQR have also recently been detected in Gram-positive microorganisms.[9] Thus, among Gram-negative bacteria, a series of TMQR has been described, including different Qnr protein families (QnrA, QnrB, QnrC, QnrD, QnrS and QnrVC) that protect antibiotic targets, ranking among the most prevalently described. Other TMQR such as the *aac-(6')-Ib-cr* gene, which encodes an aminoglycoside acetyltransferase variant that inactivates some specific quinolones such as ciprofloxacin (CIP) or

© *The Author 2013. Published by Oxford University Press on behalf of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.*

norfloxacin, and the *qepA* and *oqxA and oqxB* genes, encoding efflux systems, have been reported.[10]

Although the possibility of acquisition by transformation may not be ruled out, as described in some *Streptococci*,[9] the presence of target alterations is of clinical interest when selected in pathogenic microorganisms. However, the prevalence of TMQR among non-pathogenic microorganisms is of special concern, because these mechanisms may be potentially transferred towards pathogenic microorganisms, and then, the non-pathogenic microorganisms act as antibiotic-resistant determinant reservoirs.

Given the observed impact on health, antibiotic resistance and its mechanisms should be closely followed to identify their prevalence, bacterial reservoirs and evaluate future dissemination of antibiotic resistance mechanisms. Thus, previous studies have shown a high presence of quinolone resistance in microorganisms isolated in faeces from healthy adult Peruvian volunteers.[11] Moreover, despite their lack of use in young children, previous studies on healthy and diarrhoeic children under 1 year of age have shown a prevalence of 28% and 32% of nalidixic acid (NAL) resistance in diarrheogenic and commensal *Escherichia coli* strains, respectively.[7,12]

The aim of this study was, therefore, to analyse the molecular mechanisms of quinolone resistance in commensal and diarrheogenic *E. coli* isolated from children of less than 1 year of age.

Material and methods

Microorganisms

The *E. coli* strains were obtained from a previous prospective cohort study, conducted in 1034 children less than 12 months of age in a low socioeconomic community in Lima, Perú.[13] This study was reviewed and approved by the Ethical Review Board of the Instituto de Investigación Nutricional and by the Ethics Committee of the Universidad Peruana Cayetano Heredia.

A total of 96 *E. coli* isolates exhibiting resistance or diminished susceptibility to quinolones were analysed; of these, 46 were commensal (non DEC) and 50 were diarrheogenic *E. coli* (DEC): nine enteropathogenic *E. coli* (EPEC), 10 diffusely adherent *E. coli* (DAEC), 29 enteroaggregative *E. coli* (EAEC) and two enterotoxigenic *E. coli* (ETEC).

Antimicrobial susceptibility

Antimicrobial susceptibility to NAL and CIP was established by the disc diffusion method in accordance with Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines[14] using the *E. coli* strain ATCC 25922 as quality control. The minimal inhibitory concentration (MIC) to NAL and CIP was established by agar dilution methodology as previously described.[14]

Effect of efflux pump inhibitor

To determine the effect of efflux pumps, the efflux pump inhibitor Phe-Arg-β-Napthylamide (PAβN) was used. Thus, the MICs of both quinolones were also established in the presence of PAβN (20 mg/L) as previously described.[15]

It was considered that the efflux pumps inhibitor have an effect when the MIC decreased ≥two fold.

Presence of target mutations

The Quinolone-Resistance Determining Regions (QRDR) of the *gyrA* and *parC* genes were determined by PCR (Table 1).[16] Amplified PCR products were purified using a commercial kit (Wizard SV gel and PCR clean up system, Promega, Madison, WI, USA)

Table 1. Quinolone resistance primers used in this study

Primer	Sequence	Size	Reference
gyrA-up	5′ AAATCTGCCCGTGTCGTTGGT 3′	343pb	16
gyrA-low	5′ GCCATACCTACGGCGATACC 3′		
parC-up	5′ AAACCTGTTCAGCGCCGCATT 3′	395pb	16
parC-low	5′ GTGGTGCCGTTAAGCAAA 3′		
aac(6′)Ib-cr-up	5′ TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA 3′	482pb	17
aac(6′)Ib-cr-low	5′ CTCGAATGCCTGGCGTGTTT 3′		
qnrA-up	5′ AGAGGATTTCTCACGCCAGG 3′	580pb	18
qnrA-low	5′ TGCCAGGCACAGATCTTGAC 3′		
qnrB-up	5′ GGMATHGAAATTCGCCACTG 3′	264pb	18
qnrB-low	5′ TTTGCYGYYCGCCAGTCGAA 3′		
qnrS-up	5′ GCAAGTTCATTGAACAGGGT 3′	428pb	18
qnrS-low	5′ TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG 3′		
qepA-F	5′ CGTGTTGCTGGAGTTCTTC 3′	403pb	19
qepA-R	5′ CTGCAGGTACTGCGTCATG 3′		
oqxA-F	5′ AACCTCGTCTCCCGTGAAGAG 3′	512pb	20
oqxA-R	5′ TGAACGCTCTCCACCGCTTCA 3′		
oqxB-F	5′ TTC TCC CCC GGC GGG AAG TAC3′	392pb	20
oqxB-R	5′ CTC GGC CAT TTT GGC GCG TA3′		

and posterior sequencing was performed at Macrogen Service (Macrogen, Seoul, Korea).

Analysis of transferable mechanisms of quinolone resistance

The *aac(6′)-Ib* gene was amplified as previously described.[17] Positive PCR products were digested with *Bts*CI (New England Biolabs, Beijing, China) to identify the *aac-(6′)-Ib-cr* variant.[17] The *qnrA, qnrB, qnrS, qepA and oqxAB* genes were also detected by conventional PCR, using the primers listed in Table 1.[16–20]

Phylogenetic characterisation and clonality

The *E. coli* phylogenetic group (A, B1, B2, D) was determined using the three-locus PCR-based method described by Clermont et al.[21] Repetitive extragenic palindromic-PCR (REP-PCR) was performed to determine clonal relationships as described elsewhere.[22]

Statistical analysis

Proportions were compared using the χ^2 test or Fisher's exact test as appropriate, using Graphpad package (www.graphpad.com); p values <0.05 were considered significant.

Results

A total of 96 strains, in which the disc diffusion test showed the presence of diminished susceptibility or resistance to any of the quinolones, were analysed (Table 2).

Considering resistance patterns (Nal^R, Nal^I, and Cip^R, Cip^I, Cip^S), four profiles were described. In general the pattern most frequently observed was Nal^RCip^S 64/96 (67%), followed by Nal^RCip^R 24/96 (25%) and finally Nal^ICip^S 7/96 (7%). Among the DEC group the most frequent phenotype was Nal^RCip^S 39 (78%), followed by Nal^ICip^S seven (14%). Meanwhile, the Nal^RCip^S (24/46, 52%) and Nal^RCip^R (20/46, 43%), phenotypes were the most frequent in the non DEC group. The Nal^RCip^R phenotype was significantly more frequently detected amongst non-pathogenic isolates (20/46, 43% *vs* 4/50, 8%; $p<0.001$).

When the MIC to NAL and CIP was established, five out of seven isolates identified as Nal^I presented a NAL–MIC of 32–64 mg/L, while the remaining two cases, in which all the MICs were under the resistance breakpoints considered, the amino acid change Ser83 to Ala was detected in one case, and a *qnrB* gene was detected in the other (Table 2).

Two out of the TMQR-genes sought were detected among the present isolates, being the *aac(6′)Ib-cr* gene the most frequently found by far, followed by the *qnrB* genes. In total 32 (33%) of the isolates analysed presented at least one TMQR. Thus, 26 isolates presented the *aac(6′)Ib-cr*, 24 alone, and two concomitanly with *qnrB*. In addition, eight other isolates present the *qnrB* gene.

The results show the important role of efflux pumps in quinolone resistance acquisition. Thus, in the MIC_{50} of NAL, when the efflux pump inhibitor was added to the media, a reduction in at least two-fold dilutions was found. (Table 3)

The unusual Nal^I or Nal^R phenotype without target mutations in *gyrA* and *parC* genes was observed, being detected in 14 isolates (15%); 13 in the DEC group vs one in the non DEC group $p<0.05$. Of these, the presence of TMQR was reported in 10 isolates: QnrB in four isolates, AAC(6′)Ib-cr in five isolates and both mechanisms in one isolate. In nine out of the 14 strains the MIC to NAL decreased to values $\leq$16 in the presence of PAβN. In the remaining five isolates the mechanisms sought were not found.

From seven isolates displaying one substitution in GyrA and one in ParC (Leu83/Ile80), six displayed the Nal^R Cip^S phenotype. Meanwhile isolates with three or more substitutions in the targets were fully resistant to both quinolones (Nal^R Cip^R; Table 2).

Although not significant, differences in the prevalence of TMQR were found between the DEC and non DEC isolates. Thus, the presence of the *aac(6′)Ib-cr* gene was mainly detected in DEC isolates, being found in 17 (34%) vs nine (20%) in non DEC isolates, while QnrB was present in five (10%) DEC vs three (7%) in non DEC isolates (Figure 1).

Thirty-seven (74%) DEC and 45 (98%) non DEC isolates presented at least one mutation in the *gyrA* gene. Of these, one (2%) DEC and 26 (56%) non DEC also presented substitutions in the *parC* gene. Finally, neither the *qepA*, *qnrS* nor *oqxAB* gene was detected.

No association was observed among the specific TMQR and the specific phylogenetic group. However, when all the TMQR were considered together, they were distributed differently among the different phylogenetic groups, being more prevalent in isolates belonging to the D group ($p<0.05$). Additionally, when all the phylotypes associated with higher virulence were considered together (B2 and D) the significance of this association was increased.

No clonal relationship was observed with REP-PCR among the strains included in the present study (data not shown).

Discussion

Although the safety of the use of quinolones in children has been demonstrated,[23] their use in this population remains unusual, and limited to specific geographic areas or pathologies. Peru is not an exception, and the use of quinolones in children is not considered in clinical guidelines except for specific pathologies. However, in Peru, as in other different geographical areas, high levels of quinolone-resistance have been reported, in microorganisms isolated from ill or healthy children.[7,12] Detection of high levels of resistance to quinolones in non-exposed populations such as children, and especially in non-pathogenic microorganisms, suggests high quinolone pressure in the community.[24–26] Thus, in a study about trends in antibiotic utilisation in eight Latin American countries it was observed that the general antibiotic consumption in Peru increases 5.58 daily dose per 1000 inhabitants per day.[26] Regarding quinolones, Llanos-Zavalaga et al.[25] in a comparative study addressed to analyse the antibiotic use in different Latin American hospitals showed that CIP was by far the most prescribed antibiotic, accounting for 17.5% of the total prescriptions. Besides, the same study showed that incorrect or unnecessary antibiotic prescription rates were of 81.7%.[26] Moreover, despite the dearth of data on the veterinary use of antibacterial agents, high levels of quinolone-resistance in microorganisms isolated from different marketed meats has been shown.[27]

The extent of the problem reflects the loss of the potential of quinolones to treat various infections in which these antimicrobial agents are the standard therapy, both because the causative microorganisms are under the same selective pressure and

Table 2. Quinolone resistance patterns associated with presence of transferable mechanisms of quinolone resistance, mutations in targets and MIC in presence or absence of eflux pump inhibitor

Pathotype	N[a]	Phenotype (Nal-Cip)[b]	Qnr	ACC(6′)Ib-cr	(gyrA-83,87) (parC-80,84)	MIC NAL	MIC NAL+PAβN	PAβN decrease	MIC CIP	MIC CIP+PAβN
DAEC	2	R-S	−	+	(Leu,wt)(wt,wt)	256	16	4	0.25	0.25
	1	R-S	−	+	(Leu,wt)(wt,wt)	256	32	3	0.25	0.25
	1	R-S	−	+	wt	256	32	3	0.5	0.25
	1	R-S	−	−	(Leu,wt)(wt,wt)	256	128	1	0.5	1
	1	R-S	−	−	(Leu,wt)(wt,wt)	>256	64	>3	0.25	0.25
	1	R-R	−	−	(Leu,wt)(wt,wt)	>256	128	>2	64	64
	1	R-R	−	−	(Leu, Asn)(Ile,Val)	>256	128	>2	128	64
	2	R-R	−	−	(Leu,wt)(wt,wt)	>256	256	>1	64	64
EAEC	1	I-S	−	+	Wt	32	4	3	0.25	0.25
	1	R-S	QnrB	−	Wt	32	4	3	0.5	0.5
	2	I-S	QnrB	−	Wt	32	8	2	0.25	0.25
	1	R-S	−	+	Wt	32	8	2	0.25	0.25
	1	R-S	−	−	(Leu,wt)(wt,wt)	64	8	3	0.25	0.25
	1	R-S	−	−	(Leu,wt)(wt,wt)	64	16	2	0.125	0.25
	4	R-S	−	−	(Leu,wt)(wt,wt)	128	8	4	0.125	0.25
	1	R-S	QnrB	−	(Leu,wt)(wt,wt)	128	8	4	0.25	0.25
	3	R-S	−	+	(Leu,wt)(wt,wt)	128	16	3	0.25	0.25
	2	R-S	−	−	(Leu,wt)(wt,wt)	128	16	3	1	1
	3	R-S	−	−	(Leu,wt)(wt,wt)	128	32	2	0.25	0.25
	2	R-S	−	+	(Leu,wt)(wt,wt)	128	32	2	0.25	0.25
	1	R-S	−	+	Wt	128	64	1	0.25	0.25
	2	R-S	−	+	(Leu,wt)(wt,wt)	256	32	3	0.25	0.25
	2	R-S	−	−	(Leu,wt)(wt,wt)	256	32	3	0.5	0.25
	2	R-S	−	−	(Leu,wt)(wt,wt)	>256	128	>2	0.5	1
ETEC	1	I-S	QnrB	+	Wt	16	4	2	0.25	0.5
	1	R-S	−	−	Wt	256	32	3	0.5	0.25
	1	I-S	−	−	(Ala,wt)(wt,wt)	8	0.5	4	0.03	0.125
EPEC	1	I-S	−	−	Wt	64	4	4	1	1
	1	R-S	−	+	Wt	64	16	2	0.25	0.25
	2	R-S	−	−	Wt	64	32	1	0.25	0.5
	1	R-S	−	+	(Leu,wt)(wt,wt)	128	16	3	0.5	0.5
	2	R-S	−	−	(Leu,wt)(wt,wt)	128	32	2	0.25	0.5
	1	R-S	−	−	(Leu,wt)(wt,wt)	>256	32	>3	0.25	0.5
non DEC	1	I-S	QnrB	−	Wt	32	16	1	0.125	0.125
	1	R-I	QnrB	−	(Leu,wt)(Ile,wt)	>256	256	>1	8	16
	1	R-S	−	−	(Leu,wt)(wt,wt)	128	16	3	0.5	0.5
	1	R-S	−	+	(wt,Tyr)(wt,wt)	128	16	3	0.5	0.5
	4	R-S	−	−	(Leu,wt)(wt,wt)	128	32	2	0.25	0.25
	1	R-S	−	−	(Leu,Asp)(wt,wt)	256	32	3	0.25	0.25
	6	R-S	−	+	(Leu,wt)(wt,wt)	256	64	2	1	1
	1	R-S	−	−	(Leu,wt)(wt,wt)	256	64	2	0.25	0.25
	1	R-S	−	+	(Leu,wt)(Ile,wt)	256	64	2	1	1
	2	R-S	−	−	(Leu,wt)(wt,wt)	256	128	1	1	1
	1	R-S	−	−	(Val, wt)(wt,wt)	256	128	1	0.5	0.5
	1	R-S	QnrB	+	(Leu,wt)(wt,wt)	256	128	1	0.5	0.5
	5	R-S	−	−	(Leu,wt)(Ile,wt)	>256	256	>1	1	1
	1	R-R	−	−	(Leu,Asn)(Arg,wt)	>256	128	>2	64	32
	1	R-R	−	−	(Leu,Asn)(Tyr,wt)	>256	256	>1	8	16

Continued

Table 2. *Continued*

Pathotype	N[a]	Phenotype (Nal-Cip)[b]	Qnr	ACC(6′)Ib-cr	(gyrA-83,87) (parC-80,84)	MIC NAL	MIC NAL+PAβN	PAβN decrease	MIC CIP	MIC CIP+PAβN
	1	R-R	–	–	(Leu,Asn)(Ile,wt)	>256	≥256	1	8	8
	1	R-R	–	–	(Leu,Asn)(Ile,Gly)	>256	256	>1	32	32
	4	R-R	–	–	(Leu,Asn)(Ile,Val)	>256	≥256	1	64	64
	3	R-R	–	–	(Leu,Asn)(Ile,Gly)	>256	≥256	1	64	64
	9	R-R	–	–	(Leu,Asn)(Ile,wt)	>256	256	>1	64	64

DAEC: diffusely adherent *E. coli*; DEC: diarrheogenic *E. coli*; EAEC: enteroaggregative *E. coli*; EPEC: enteropathogenic *E. coli*, ETEC: enterotoxigenic *E. coli*; MIC: minimal inhibitory concentration; PAβN: Phe-Arg-β-Napthylamide, efflux pump inhibitor; wt: wild type.
[a] Number of isolates.
[b] Phenotype NAL (nalidixic acid) and CIP (ciprofloxacin) by disc diffusion (I: intermediate; R: resistant; S: susceptible).

Table 3. MIC values to NAL and NAL plus efflux pump inhibitor according to phenotypes and diarrheogenic group

Groups	Phenotypes	MIC_{50} NAL (mg/L)	MIC_{50} NAL+PAβN (mg/L)
DAEC	$Nal^R Cip^S$	256	32
DAEC	$Nal^R Cip^R$	>256	128
EAEC	$Nal^R Cip^S$	128	32
EPEC	$Nal^R Cip^S$	128	32
Non DEC	$Nal^R Cip^S$	256	64
Non DEC	$Nal^R Cip^R$	>256	256

Cip: ciprofloxacin; DAEC: diffusely adherent *Escherichia coli*; DEC: diarrheogenic *E. coli*; EAEC: enteroaggregative *E. coli*; EPEC: enteropathogenic *E. coli*; MIC: minimal inhibitory concentration; NAL: nalidixic acid (in lower case, Nal is related to bacterial phenotype)

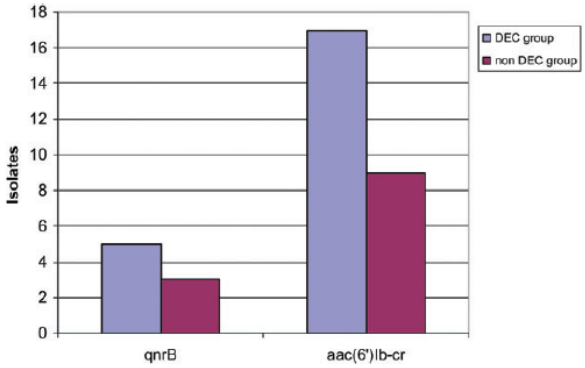


Figure 1. Distribution of transferable mechanisms of quinolone resistance in diarrheogenic *Escherichia coli* (DEC) and commensal (non DEC) groups

because of the appearance and the long dissemination of TMQR after their first description in 1998, acting as risk factors for the development of full quinolone resistance.[9] The results show the presence of quinolone resistance in non clonally related strains, showing that the presence of quinolone resistant microorganisms in the area, is not due to selection and dissemination of a specific strain, but to extensive antibiotic pressure resulting in the selection of a variety of quinolone resistant mechanisms and subsequently in the spreading of multiple quinolone resistant isolates in the area.

The present data showed both the high relevance of the target mutations in the development of full resistance to fluoroquinolones[28] and the presence of different TMQR in the study area. Full resistance to quinolones occurs mainly as a result of mutations in the chromosomal genes encoding quinolone targets.[28,29] Thus, in accordance with the literature,[8,28] mutations in the *gyrA* gene at position 83 (leading to Leu, Val or Ala) were the most frequent quinolone-resistance mechanism observed in the *E. coli* DNA Gyrase, being associated with moderate increases in the levels of quinolone resistance. Only one isolate presented the amino acid substitution Ser83 to Ala, with its MICs levels to NAL and CIP being the lowest. Previous reports have shown that the alteration in the hydrophobicity that results from this amino acid change is lesser than that due to the changes Ser-83 to Val / Leu, and this fact has been related to a lesser effect on the ability to hinder the quinolone/target interactions thereby resulting in low levels of quinolone resistance.[28] Another unusual single amino acid change, Asp87 to Tyr, was also observed. Although mutations at codon 87 have been extensively related to the acquisition of quinolone resistance, alterations at codon 87 (except in specific microorganisms such as *Salmonella* spp.), in *E. coli* and other Gram-negative microorganisms appear as secondary after a primary mutation in codon 83. High levels of resistance have also been associated with the presence of multiple mutations in the QRDRs.[28]

The PAβN-inhibitible efflux pumps play a relevant but usually clinically hidden role in the basal levels of NAL resistance.[15,30] Thus, the inhibition of this kind of efflux pump resulted in 27 isolates with a decrease in their NAL–MIC under the breakpoint considered. Independently of the presence of TMQR, these 27 isolates presented one single amino acid change in GyrA, in accordance with that described by Saenz et al.[15]

The QnrB, and AAC(6′)Ib-cr were detected in our isolates. Interestingly, in 10 isolates those mechanisms were not associated with target-mutations; five displayed full resistance to NAL and five were intermediate resistant to NAL. However, in four cases a single AAC(6′)Ib-cr encoding gene was detected, and this enzyme does not inactive NAL.[9,31] In one of these four isolates, overexpression of PAβN-inhibitible efflux pumps may be adduced, but in the remaining three cases the isolates remained over the NAL resistance breakpoint after the addition of PAβN. It is important to mention that in four isolates no resistance mechanism was identified; these isolates remain with NAL MIC levels higher than 32 mg/L after the addition of PAβN, suggesting the presence of unusual resistance mechanisms in the study area, such as decreased uptake due to a reduction in porins expression, overexpression of efflux pumps other than those PAβN-inhibitible, mutations in the *parE* or *gyrB* genes[28] or another more infrequent TMQR such as QnrD, QnrC or its recently proposed closely phylogenetically group QnrVC.[32]

TMQR genes confer low levels of quinolone resistance and it has been suggested that these mechanisms facilitate the selection of higher levels of resistance of quinolone resistance mutants.[9,10] Thus, it has been shown that QnrA1, QnrB1 and QnrS1, may play a significant role in the acquisition of clinical resistance to fluoroquinolones, and therefore, therapeutic failure in treatment.[10] The presence of a single TMQR usually does not confer full resistance to these antimicrobial agents, but rather increases the risk of developing quinolone resistance. Thus, the diversity, and high number of TMQR in the present samples, together with the non-controlled use of quinolones, may explain the high levels of quinolone-resistance in this area.[7,12]

In conclusion, the mechanisms involved in quinolone resistance have been shown in a non-directly exposed vulnerable population, mostly breastfed infants, living in an area under high antibiotic pressure. A relatively high prevalence of different TMQR has been detected in this area, showing the real risk of a relatively easy selection of fluoroquinolone-resistant microorganisms.

Authors' contributions: MJP, JR designed the study. MJP, SM and CG performed the experiments MJP, SM, CG, LJV, TJO and JR gathered data and isolates. MJP, JR analysed the data. MJP and JR wrote the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript. MJP is guarantor of the paper.

Acknowledgements: Thanks to Laura Puyol and Diana Barrios for their support in the laboratory management.

Funding: This work has been partially funded by Agencia Española de Cooperación Internacional al Desarrollo [grant numbers D/019499/08, D/024648/09 and D/030509/10 (JR, TJO)], the Fogarty International Center, National Institute of Health, USA [grant 1K01TW007405 (TJO)]. JR has a fellowship from the program I3, of the ISCIII [grant number: CES11/012].

Competing interests: None declared.

Ethical approval: This study was approved by the Ethical Review Board of the Instituto de Investigación Nutricional and by the Ethics Committee of the Universidad Peruana Cayetano Heredia

References

1 Okeke IN, Laxminarayan R, Bhutta ZA et al. Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. Lancet Infect Dis 2005;5:481–93.

2 Sharma M, Eriksson B, Marrone G et al. Antibiotic prescribing in two private sector hospitals; one teaching and one non-teaching: A cross-sectional study in Ujjain, India. BMC Infect Dis 2012;12:155.

3 Chandy SJ, Thomas K, Antonisamy B et al. Patterns of antibiotic use in the community and challenges of antibiotic surveillance cross-sectional study in Vellore, south India. J Antimicrob Chemother 2013;68:229–36.

4 Silveira de Castro M, Pilger D, Cardoso Ferreira MB, Kopittke L. Trends in antimicrobial utilization in a university hospital, 1990–1996. Rev Saúde Pública 2002;36:553–8.

5 García C, Horna G, Linares E et al. Antimicrobial drug resistance in Peru. Emerg Infect Dis 2012;18:520–1.

6 Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sander HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). Diagn Microbiol Infect Dis 2012;73:354–60.

7 Pons MJ, Mosquito S, Ochoa TJ et al. Niveles de resistencia a antimicrobianos, en especial a quinolonas, en cepas de *Escherichia coli* comensales en niños de la zona periurbana de Lima, Perú. Rev Peru Med Exp Salud Pública 2012;29:82–6.

8 Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. Emerg Infect Dis 2001;7:337–41.

9 Ruiz J, Pons MJ, Gomes C. Transferable mechanisms of quinolone resistance. Int J Antimicrob Agents 2012;40:196–203.

10 Rodriguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: An update. J Infect Chemother 2011;17:149–82.

11 Nys S, Okeke IN, Kariuki S et al. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* from healthy volunteers from eight developing countries. J Antimicrob Chemother 2004;54:952–5.

12 Ochoa TJ, Ruiz J, Molina M et al. High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* in infants in Peru. Am J Trop Med Hyg 2009;81:296–301.

13 Ochoa TJ, Ecker L, Barletta F et al. Age-related susceptibility to infection with diarrheagenic *Escherichia coli* among infants from periurban areas in Lima, Perú. Clin Infect Dis 2009;49:1694–1702.

14 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-first Informational Supplement M100-S21.2011. Wayne, PA, USA: CLSI; 2011.

15 Sáenz Y, Ruiz J, Zarazaga M et al. Effect of efflux pump inhibitor Phe-Arg-β-naphthylamide on the MIC values of quinolones, tetracycline and chloramphenicol in *Escherichia coli* isolates of different origin. J Antimicrob Chemother 2002;53:544–5.

16 Vila J, Ruiz J, Goñi P, Jimenez de Anta MT. Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli.* Antimicrob Agents Chemother 1996;40:491–3.

17 Park CH, Robicsek A, Jacoby GA et al. Prevalence in the United States of aac(6′)-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:3953–5.

18 Cattoir V, Poirel L, Rotimi V et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. J Antimicrob Chemother 2007;60:394–7.

19 Yamane K, Wachino JI, Suzuki S, Arakawa Y. Plasmid-mediated qepA gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:1564–6.

20 Kim HB, Wang M, Park CH et al. OqxAB encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:3582–4.

21 Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl Environ Microbiol 2000;45:55–8.

22 Vila J, Marcos MA, Jimenez de Anta MT. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus- A. baumannii* complex. J Med Microbiol 1996;44:482–9.

23 Murray TS, Baltimore RS. Pediatric uses of fluoroquinolone antibiotics. Pediatr Ann 2007;36:336–42.

24 Ecker L, Ochoa TJ, Vargas M et al. Factors affecting caregivers' use of antibiotics available without a prescription in Peru. Pediatrics 2013;131:e1771–9.

25 Llanos-Zavalaga LF, Mayca J, Contreras C. Características de la prescripción en los consultorios de medicina del hospital Cayetano Heredia de Lima, Perú. Rev Esp Salud Pública 2002;76:207–14.

26 Wirtz VJ, Dreser A, Gonzales R. Trends in antibiotic utilization in eight Latin American countries, 1997–2007. Rev Panam Salud Pública. 2010;27:219–25.

27 Ruiz L, Pons MJ, Gomes C et al. High antimicrobial-resistance levels of *Escherichia coli* isolated from meat of several markets in Lima, Peru. Trop Med Int Health 2013:18(Suppl 1):173.

28 Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: Target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. J Antimicrob Chemother 2003;51:1109–17.

29 Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. Front Microbiol 2012;3:24.

30 Ribera A, Ruiz J, Jimenez de Anta MT, Vila J. Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. J Antimicrob Chemother 2002;49:697–8.

31 Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. Clin Microbiol Rev 2009;22:664–89.

32 Pons MJ, Gomes C, Ruiz J. QnrVC, a new transferable Qnr-like family. Enferm Infecc Microbiol Clin 2013;31:191–2.

ARTICLE 4

Antimicrobial resistance in *Shigella* spp. causing traveller's diarrhoea (1995-2010): A retrospective analysis

Resistència antimicrobiana en *Shigella* spp. causants de la diarrea del viatger (1995-2010): Un anàlisi retrospectiu

Pons MJ, Gomes C, Martínez-Puchol S, Ruiz L, Mensa L, Vila J, Gascón J, Ruiz J.

Travel Medicine and Infectious Disease. 2013 Jul 23. doi:pii: S1477-8939(13)00103-8. 10.1016/j.tmaid.2013.06.010.

RESUM

La shigelosis és un problema de salut a nivell global, causant d'una morbiditat important entre els viatgers que retornen de zones tropicals. Aquest estudi va tenir com a objectiu descriure l'evolució del perfil de resistència als antimicrobians en soques de *Shigella* spp. aïllades en pacients que presentaven diarrea del viatger (DV) en retornar de zones tropicals.

Es van observar els nivells de sensibilitat a antibiòtics a un total de 191 *Shigella* spp. aïllades durant el període del 1995 al 2010. Els pacients van ser atesos al Servei de Medicina de l'Hospital Clínic de Barcelona, després d'haver tornat amb símptomes de diarrea després d'un viatge a zones tropicals.

Per analitzar les dades, es van establir 2 períodes diferents: el primer establert entre 1995-2000 i entre 2001-2010 el segon, incloent 96 i 95 aïllats, respectivament en cada període.

Els països visitats pels viatgers van ser classificats en 10 grups segons les zones geogràfiques visitades: Carib, Amèrica Central, Amèrica del Sud tropical, Nord d'Àfrica,

Est d'Àfrica, Oest d'Àfrica, Àfrica Central Subcontinent Indi, Orient Mitjà, i Sud-est d'Àsia, o "múltiple" quan el viatger havia visitat dos o més països que no pertanyien a la mateixa àrea.

Observant els resultats, es va trobar una disminució dels casos de diarrea causada per *Shigella* en els últims anys. Es va observar un ampli ventall de resistències en les soques estudiades, sobretot alts nivells de resistència a la tetraciclina (84%), cotrimoxazole (75,5%), i ampicil·lina (45,5%). La resistència fou baixa a ciprofloxacina (2,1%) i als nous antibiòtics proposats com alternatives de tractament com fou el cas de l'azitromicina (3,9%) i la furazolidona (8,4%). Observant les diferències segons el periode, en el cas d'ampicil·lina, amoxicil·lina més àcid clavulànic i el cloramfenicol els valors de la resistència foren reduïts de manera significativa a partir de 1995-2000 vs. 2001-2010, (62.5% vs 28.4 %, 19.8 % vs 6.6 %, 23.4 vs 10.4 %, respectivament). Al contrari que els casos de l'àcid nalidíxic i la tetraciclina, on l'evolució de la resistència ha anat en augment amb el temps .

També s'observà que les zones geogràfiques que presentaven majors casos de shigelosis, foren Àfrica de l'oest, el subcontinent Índi, Àfrica del nord i Amèrica Central. Destacar l'elevat número de soques multiresistents, en especial en àrees com el Carib, Amèrica Central, el subcontinent índi, i el sud-est asiàtic.

Anomenar que tant en azitromicina con en furazolidona, els nivells de resistència foren baixos, independentment del seu origen geogràfic.

Concloent que s'han observat diferents patrons de resistència a antimicrobians segons espècie i zona geogràfica. Aquests resultats mostren els diferents patrons de resistència en les diferents regions del món, en funció del seu ús en aquestes zones.

Travel Medicine and Infectious Disease (2013) 11, 315–319

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: www.elsevierhealth.com/journals/tmid

Antimicrobial resistance in *Shigella* spp. causing traveller's diarrhoea (1995–2010): A retrospective analysis

M.J. Pons [a], C. Gomes [a], S. Martínez-Puchol [a], L. Ruiz [a], L. Mensa [a,1], J. Vila [a,b], J. Gascón [a], J. Ruiz [a,*]

[a] *Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain*
[b] *Department of Clinical Microbiology, School of Medicine, IDIBAPS, Barcelona, Spain*

Received 2 January 2013; received in revised form 26 June 2013; accepted 27 June 2013
Available online 23 July 2013

KEYWORDS
Traveller's diarrhoea;
Antimicrobial resistance;
Shigella spp.

Summary *Background:* Shigellosis is a global human health problem causing an important morbidity among travellers returning from tropical areas. This study was aimed to describe the evolution of antimicrobial resistance profile in *Shigella* spp. isolated between the years 1995–2010 in patients with traveller's diarrhoea (TD) returning from tropical areas.
Methods: The levels of antimicrobial resistance were tested in a total of 191 *Shigella* spp. isolated during the period from 1995 to 2010.
Results: A decrease of cases of diarrhoea caused by *Shigella* has been observed in recent years. A wide spectrum of antibiotic resistance was observed among *Shigella* spp. These isolates showed high levels of resistance to tetracycline (84%), co-trimoxazole (75.5%), and ampicillin (45.5%). The resistance was low to ciprofloxacin (2.1%), azithromycin (3.9%) and furazolidone (8.4%). According to the period, in the case of ampicillin, amoxicillin plus clavulanic acid, chloramphenicol, values of resistance were significantly decreasing from 1995–2000 to 2001–2010, (62.5% vs. 28.4%, 19.8% vs. 6.6%, 23.4 vs. 10.4%, respectively). Meanwhile in nalidixic acid and tetracycline the evolution of resistance has increased over time.
Conclusions: A decrease in the isolation number of *Shigella* spp. causing TD has been observed. Differential trends in the evolution of the levels of resistance to the tested antibacterial agents have been observed.
© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. CRESIB, Ed. CEK pl 1, C/Rosselló 149-153, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932275400x4547; fax: +34 932279853.
E-mail addresses: joruiz@clinic.ub.es, quim.ruiz@cresib.cat (J. Ruiz).
[1] Present address: Departament d'Hepatologia, IDIBAPS, Barcelona, Spain.

1477-8939/$ - see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.tmaid.2013.06.010

Introduction

Diarrhoea is the most common pathology affecting children in developing countries, and also causes an important morbidity among travellers returning from tropical areas (traveller's diarrhoea, TD) [1,2].

The risk of acquiring TD is influenced by factors such as the destination, duration of the stay, standard of accommodation, type of travel, age of the travellers, and also by individual risk factors. Additionally, preventive strategies such as hygiene measures have limited impact [3].

Shigellosis is a global human health problem and is characterised by symptoms including diarrhoea and/or dysentery with frequent mucous bloody stools, abdominal cramps and tenesmus. Four species of *Shigella*: *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella boydii* and *Shigella dysenteriae* are able to cause this disease. The most frequent mode of transmission is by faecal—oral contact and it is highly contagious due to low infectious inoculum. Thus, inoculums with only 10 microorganisms are able to cause the illness [4].

Shigellosis is generally a self-limiting disease. Severe dehydration is uncommon, but oral rehydration is highly recommended. In addition, depending on the severity of the disease, antibiotic treatment may be necessary with quinolones and cephalosporins being drugs of choice [4]. Nonetheless, the global emergence of antimicrobial resistance makes the choice of antimicrobial agents for treating shigellosis limited [4]. *Shigella* resistance to sulfonamides, tetracyclines, ampicillin and co-trimoxazole has been described worldwide, and these agents are not recommended as empirical therapy [4].

Since antibiotic resistance is a severe global health problem, which can lead to inefficiency of antimicrobial agents and therapeutic failure, surveillance of the development of antimicrobial resistance should be performed, establishing the molecular mechanisms of resistance to thereby design alternative treatments [5].

Data related to the antimicrobial resistance of *Shigella* spp. from 1995 to 2000 have been described in previous studies by our hospital [6]. The aim of this study was to expand these data, describing the evolution of antimicrobial resistance profile in *Shigella* spp. isolated between the years 1995—2010 in patients with TD returning from tropical areas.

Material and methods

A total of 191 *Shigella* spp. isolates from patients visiting the Tropical Medicine Unit at the Hospital Clinic of Barcelona (Spain), after having returned with diarrhoea symptoms following a trip to tropical countries during the period from 1995 to 2010 were included in the study and recovered from frozen stocks. Of these, those isolated from the period 1995—2000 had previously been partially analysed by Navia et al. [6]. To analyse the data two different periods were established: 1995—2000 and 2001—2010 including 96 and 95 isolates, respectively.

The countries visited by the travellers were classified into 10 groups according to the geographical areas visited: Caribbean, Central America, Tropical South America, North Africa, Indian Subcontinent, Middle East, East Africa, West Africa, Southeast Asia, and Central Africa. We defined the travel destination as "multiple" when the traveller had visited two or more countries not belonging to the same area.

Antimicrobial susceptibility testing was carried out by the disc diffusion method, in two different moments, according to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI) [7] using discs of ampicillin (AMP, 10 μg), amoxicillin plus clavulanic acid (AMC, 20/10 μg), nalidixic acid (NAL, 30 μg), ciprofloxacin (CIP, 30 μg), chloramphenicol (CM, 30 μg), tetracycline (TC, 30 μg) and co-trimoxazole (SXT, 23.75 μg/1.25 μg). In isolates from frozen stock unable to be grown (2 from first period and 15 from second period), data on antimicrobial susceptibility recorded in the laboratory database were used. In a posterior moment the susceptibility levels of azithromycin (AZM, 15 μg) and furazolidone (FUR, 100 μg) were tested in the 131 isolates, which grown again from frozen stock. The breakpoints for AZM and FUR have not been established to date, and therefore resistance to AZM was considered with diameter halos $\leq$ 15 mm, while halos $\leq$14 mm (nitrofurantoin breakpoint as per the CLSI) were considered to define resistance/susceptibility to FUR.

In this study, multidrug resistance (MDR) was defined as the presence of resistance to at least two unrelated antimicrobial agents. This approach was used because most of the isolates were from low-income countries.

Statistical analyses were performed using the Fisher test.

Results

A total of 191 *Shigella* spp. were isolated as a cause of traveller's diarrhoea at the Hospital Clinic of Barcelona during the study period (1995—2010). One hundred ten (57.6%) out of these 191 isolates were *S. sonnei*, while 72 (37.7%) were *S. flexneri*, 7 (3.7%) were *S. dysenteriae*, 1 (0.5%) *S. boydii* and finally 1 (0.5%) was not identified at the species level. On distribution of the species between the two study periods, the prevalence of *S. sonnei* and *S. flexneri* were found to alternate during the first period (1995—2000), Thus *S. flexneri* was the most prevalent species isolated in the first period, while *S. sonnei* was the most prevalent serogroup isolated in the second period (2000—2010) (Fig. 1). We also observed a decrease in the cases of diarrhoea caused by *Shigella* spp. in recent years, especially after the year 2007 (Fig. 1).

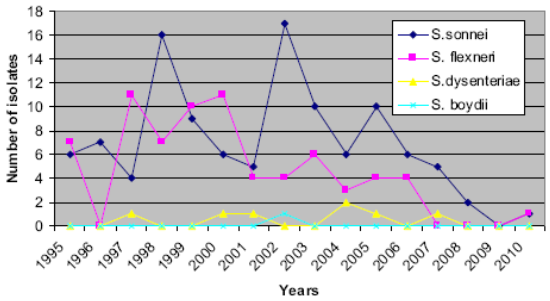


Figure 1 Evolution of *Shigella* spp. isolates during the period 1995—2010.

Antibiotic resistance was analysed according to the period, specie and travel destination area. A wide spectrum of antibiotic resistance was observed among *Shigella* spp. These isolates showed high levels of resistance to TC (84%), SXT (75.5%), and AMP (45.5%), while resistance was low to CIP (2.1%), AZM (3.9%) and FUR (8.4%) (Table 1). According to the period studied, in the case of AMP, AMC, CM, the values of resistance significantly decreased from 1995—2000 to 2001—2010, (62.5% vs. 28.4%, 19.8% vs. 6.6%, 23.4 vs. 10.4%, respectively). On the other hand, in some antibiotics such as NAL and TC the evolution of resistance showed an increase over time, with the highest values being observed in last years (4.2% vs. 19.5% and 77.1% vs. 92.5%) (Table 1).

The difference between the levels of resistance among species was remarkable. Thus, levels of antimicrobial resistance were higher in *S. flexneri* compared with *S. sonnei* in the case of AMP (69% vs. 32.1%), AMC (47.7% vs. 5.6%) and CM (40.6% vs. 1.9%), respectively ($p < 0.05$). The *S. sonnei* and *S. flexneri* evolution of antimicrobial resistance levels is presented in Table 2.

By contrast, the levels of resistance to SXT were higher in *S. sonnei* than in *S. flexneri*, 88.9% vs. 61.4%, respectively. No significant differences were found in the levels of the remaining antibiotics tested. Regarding general multiresistance levels, there were no differences between the two most prevalent species (Table 2).

In the last 15 years, the geographic area presenting the greatest number of travellers with shigellosis is West Africa, with 45 *Shigella* isolates (either *S. sonnei* or *S. flexneri*), followed by the Indian subcontinent (34 isolates), North Africa (28 isolates) and Central America (24 isolates). In the latter three areas the most prevalent species recovered was *S. sonnei* (Table 3).

The resistance to TC detected was found to be high worldwide. The lowest value was found in the Caribbean with 66.6% of resistance, being up to 100% in areas such as Southeast Asia or 93.3% in the Indian subcontinent. The same was observed with SXT, while resistance to AMP was also high in all the areas visited by travellers, albeit lower than TC or SXT. Resistance to NAL was only relevant in isolates from travellers returning from the Indian subcontinent in which resistance was 48.4% (Table 3).

More than 50% of the strains from areas such as the Caribbean, Central America, the Indian subcontinent and Southeast Asia presented multiresistance as defined above.

The isolates studied presented quite low levels of resistance to AZM and FUR, being 3.9% and 8.4% respectively, irrespective of their geographical origin (Table 1).

Discussion

The present data show that in general the number of *Shigella* isolates isolated in recent years as a cause of TD among Spanish travellers has fallen sharply, especially since the year 2007. This may be due to either a change in the final destination of the travellers, who may now go to countries with better hygiene conditions or may be related to a change in the global economic situation, which could result in a decrease of *Shigella* in international destinations, The microorganisms causing TD reflect the situation of the countries visited, making the study of the profile of antibiotic resistance a very important global health issue. In fact the study of microbes in TD serves to sample resistance levels of respective countries in which, both only few data are often reported and scarce and ancient antibiotic arsenal is usually available.

The evolution of resistance to some antibiotics such as NAL and TC has shown an increase in the levels of resistance over time, with the highest values observed in recent years in agreement with the general trend of increased resistance worldwide [8]. In the case of NAL, this fact is related to the increased number of *Shigella* strains from India isolated in the second period. In this area *Enterobacteriaceae* are typically more resistant to quinolones [7—9].

On the other hand, decreasing levels of resistance to AMP, AMC, were observed in the last ten years studied. This fact may be related both with the high number of *S. sonnei* isolated in the second period, because they have lower levels of antimicrobial resistance, and also may be related with a change in the antimicrobial usage in respective countries.

Alternative treatment is necessary to treat diarrhoea caused by *Shigella* spp. In travellers returning from some

Table 1 Antibiotic resistance levels among *Shigella* spp. isolated.

Antimicrobial agents	Total 1995—2010	$N = 96$	$N = 95$	Total 191
		1995—2000	2001—2010	*p*-Value
AMP	87/191 (45.5%)	60/96 (62.5)	27/95 (28.4)	0.0001(*)
AMC	25/187 (13.4%)	19/96 (19.8)	6/91 (6.6)	0.0001(*)
NAL	21/183 (11.5%)	4/96 (4.2)	17/87 (19.5)	0.0001(*)
CIP	4/190 (2.1%)	0/96 (0)	4/94 (4.3)	0.1212
SXT	142/188 (75.5%)	69/95 (72.6)	73/93 (78.5)	0.511
CM	30/171 (17.5%)	22/94 (23.4)	8/77 (10.4)	0.024(*)
TC	148/176 (84.1%)	74/96 (77.1)	74/80 (92.5)	0.0025(*)
AZM	5/131 (3.8%)	2/51 (3.9)	3/80 (3.8)	1
FUR[a]	11/131 (8.4%)	4/51 (7.8)	7/80 (8.7)	1

AMP: Ampicillin, AMC: Amoxicillin plus clavulanic acid, NAL: Nalidixic Acid; CIP: Ciprofloxacin; SXT: Co-trimoxazole; CM: Chloramphenicol; TC: Tetracycline; AZM: Azithromycin; FUR: Furazolidone.
*Statistically significant (*p*-value < 0.05).
[a] CLSI breakpoint for nitrofurantoin was used.

Table 2 Antibiotic resistance levels according to *Shigella* spp. species and period.

Species	AMP	AMC	NAL	CIP	SXT	CM	TC	Multiresistance
S. flexneri (1995–2010)	49/71 (69%)	31/65 (47.7%)	6/69 (8.7%)	1/64 (1.6%)	43/70 (61.4%)	26/64 (40.6%)	54/65 (83.1%)	39/69 (56.5%)
S. sonnei (1995–2010)	35/109 (32.1%)	6/106 (5.6%)	14/103 (13.6%)	4/109 (3.7%)	97/109 (88.9%)	2/101 (1.9%)	88/102 (86.3%)	53/88 (60.2%)
p-Value	0.0001*	0.0001*	0.5928	0.6827	0.0001*	0.0001*	0.6965	0.6675
S. flexneri (1995–2000)	33/43 (76.7%)	15/43 (34.9%)	2/43 (4.6%)	0/43 (0%)	24/43 (55.8%)	19/42 (45.2%)	36/43 (83.7%)	
S. flexneri (2001–2010)	17/26 (65.4%)	5/26 (19.3%)	4/24 (16.6%)	1/26 (3.8%)	19/25 (76%)	4/23 (17.4%)	19/23 (82.6%)	
p-Value	0.08	0.01*	0.01*	0.0001*	0.004*	0.0001*	1	
S. sonnei (1995–2000)	24/45 (53.3%)	2/45 (4.4%)	2/45 (4.4%)	0/45 (0%)	38/45 (84.4%)	0/45 (0%)	32/45 (71.1%)	
S. sonnei (2001–2010)	10/60 (16.6%)	3/57 (5.3%)	11/54 (20.4%)	3/60 (5%)	54/60 (90%)	2/52 (3.8%)	50/53 (94.4%)	
p-Value	0.0001*	1	0.0008*	0.059	0.39	0.1212	0.0001*	

*Statistically significant (p-value < 0.05).

Table 3 Antibiotic resistance levels in *Shigella* spp. isolates according to area visited.

Area visited	*N*	*S. flexneri*	*S. sonnei*	*S. dysenteriae*	*S. boydii*	AMP	AMC	NAL	CIP	SXT	CM	TC	Multiresistance
						R/N (%)	*R/N* (%)	*R/N* (%)	*R/N* (%)	*R/N* (%)	*R/N* (%)	*R/N* (%)	*R/N* (%)
Caribbean	11	8	3	0	0	6/11 (54.5)	3/11 (27.3)	1/10 (10)	0/11 (0)	9/11 (81.8)	1/9 (11.1)	6/9 (66.6)	5/10 (50)
Central America	24	7	17	0	0	19/24 (79.2)	4/24 (16.6)	0/23 (0)	0/24 (0)	21/24 (87.5)	5/22 (22.7)	18/22 (81.8)	12/23 (52.2)
Tropical South America	15	9	6	0	0	10/15 (66.6)	4/15 (26.6)	0/15 (0)	0/15 (0)	12/15 (80)	7/15 (46.6)	15/15 (100)	7/15 (46.6)
North Africa	28	5	18	2	0	8/26 (30.8)	1/26 (3.8)	0/25 (0)	0/26 (0)	20/26 (76.9)	2/24 (8.3)	15/24 (62.5)	3/26 (11.5)
Indian Subcontinent	34	8	22	2	1	12/34 (35.3)	2/34 (5.9)	15/31 (48.4)	2/34 (5.9)	26/33 (78.8)	4/29 (13.8)	28/30 (93.3)	19/32 (59.4)
Middle East	6	1	5	0	0	2/6 (33.3)	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)	5/6 (83.3)	0/5 (0)	5/6 (83.3)	2/6 (33.3)
East Africa	11	4	7	0	0	6/11 (54.5)	1/10 (10)	0/10 (0)	0/10 (0)	8/11 (72.7)	3/10 (30)	9/11 (81.8)	4/11 (36.4)
West Africa	45	23	20	2	0	19/45 (42.2)	6/45 (13.3)	2/45 (4.5)	0/45 (0)	29/45 (64.4)	8/44 (18.2)	39/43 (90.7)	18/45 (40)
Southeast Asia	5	1	4	0	0	1/5 (20)	1/4 (25)	1/4 (25)	0/5 (0)	5/5 (100)	1/4 (25)	4/4 (100)	3/5 (60)
Central Africa	5	2	2	1	0	3/5 (60)	2/5 (40)	0/5 (0)	0/5 (0)	4/5 (80)	0/5 (0)	4/5 (80)	2/5 (40)
Multiple	7	2	5	0	0	2/7 (28.6)	3/7 (42.8)	1/7 (14.3)	1/7 (14.3)	7/7 (100)	0/7 (0)	6/7 (85.7)	2/7 (28.6)

specific areas, such as the Indian subcontinent [7,9], in which quinolones are losing their utility or in the treatment of locally transmitted diarrhoea. Different antimicrobial agents have been proposed such as AZM or FUR [10—13]. Despite the lack of a established resistance breakpoint, in the present report the resistance levels to both antimicrobial agents was low, showing their potential to be used as treatment if necessary.

AZM, a macrolide with excellent intracellular penetration, has been shown to be effective in the treatment of shigellosis [11] and its use is recommended in diarrhoea caused by *Shigella* in children, or in general in some regions of Latin America [12]. On the other hand, the use of FUR is increasing in Latin American countries such as Peru or Nicaragua to treat intestinal diseases including infantile diarrhoea caused by *Shigella* or other enteric bacteria [14]. In addition, its price is cheaper compared with other antibiotics, including AZM, and recent *in vitro* studies have shown low selection of FUR-resistant mutants [15]. Thus, FUR may be a possible alternative. However, it is need to take into account that a series of FUR side effects has been described [16].

A decrease in the isolation of *Shigella* spp. has been detected in the last years, and differential trends in the evolution of the levels of resistance to the tested antibacterial agents has been observed. Trends in antibiotic consumption in a specific region influence the resistance profiles of bacteria circulating in an area. Therefore the pattern of resistance and the differences over the years, show the impact of the use of certain antibiotics on the resistance of the circulating strains, thereby demonstrating the evolution and constant change of antibiotic resistance around the world.

Funding

J.R. has a fellowship from the program I3, of the ISCIII (grant number: CES11/012).

J.G is supported by grant 2009SGR385 and J.R. by grant 2009SGR685 from the Department d'Universitats, recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya, Spain.

Conflict of interest

No author have conflict of interests.

References

[1] Gascón J. Epidemiology, etiology and pathophysiology of traveler's diarrhea. Digestion 2006;73:102—8.
[2] Gascón J, Vila J, Valls ME, Mallart M, Corachán Ml. Etiology of traveler's diarrhea in Spanish travellers to developing countries. Eur J Epidemiol 1993;9:217—23.
[3] Kollaritsch H, Paulke-Korinek M, Wiedermann U. Traveler's diarrhea. Infect Dis Clin North Am 2012;26:691—706.
[4] Niyogi SK. Shigellosis. J Microbiol 2005;43:133—43.
[5] World Health Organization. WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance 2001.
[6] Navia MM, Gascón J, Vila J. Analysis of the mechanisms of resistance to several antimicrobial agents in *Shigella* spp. causing travellers' diarrhoea. Clin Microbiol Infect 2005;12:1044—7.
[7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement M100-S21. Wayne, PA, USA: CLSI; 2011.
[8] Mendez-Arancibia E, Pitart C, Ruiz J, Marco F, Gascón J, Vila J. Evolution of antimicrobial resistance in enteroaggregative *Escherichia coli* and enterotoxigenic *Escherichia coli* causing traveller's diarrhoea. J Antimicrob Chemother 2009;64:343—7.
[9] Mensa L, Marco F, Vila J, Gascón J, Ruiz J. Quinolone resistance among *Shigella* spp. isolated from returning from India. Clin Microbiol Infect 2008;3:279—81.
[10] Jeon YL, Nam Y, Lim G, Cho SY, Kim YT, Jang JH, et al. Quinolone-resistant *Shigella flexneri* in a patient who travelled to India. Ann Lab Med 2012;32:366—9.
[11] Basualdo W. Randomized comparison of azithromycin versus cefixime for treatment of shigellosis in children. Pediatr Infect Dis J 2003;22:347—77.
[12] DuPont HL. Bacterial diarrhea. N Engl J Med 2009;361:1560—9.
[13] Poma Galvez J. Diarrea disenterica en niños: el uso de antibioticos según la encuesta demográfica y de salud familiar — Endes 2011. Rev Gastroenterol Perú 2012;32:429.
[14] Ministerio de Salud, Gobierno de Nicaragua. Guía para el abordaje de las enfermedades infecciosas más comunes de la infancia y la desnutrición. Managua, Nicaragua 2009.
[15] Martínez-Puchol S, Gomes C, Pons MJ, Ruiz L, Torrents A, Ochoa TJ, et al. In vitro development and analysis of *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* furazolidone-resistant mutants. In: XXIII European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2013P1192. Berlin, Germany.
[16] Jin X, Tang S, Chen Q, Zou J, Zhang T, Liu F, et al. Furazolidone induced oxidative DNA damage via up-regulating ROS that caused cell cycle arrest in human hepatoma G2 cells. Toxicol Lett 2011;201:205—12.

ARTICLE 5

In vitro antimicrobial activity of rifaximin against enteropathogens causing traveler's diarrea

Activitat antimicrobiana *in vitro* de la rifaximina en enteropatògens causants de la diarrea del viatger

Ruiz J, Mensa L, O'Callaghan C, **Pons MJ**, González A, Vila J, Gascón J.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2007 Dec;59(4):473-5.

RESUM

De la diarrea del viatger (DV) d'origen bacterià, un dels principals agents causals són les *E. coli* diarreogèniques (especialment EAEC i ETEC). Quan el cas ho requereix, es adient donar teràpia amb antimicrobians per pal·liar els símptomes. En els darrers anys, i degut a un increment en les resistències arreu del món, les teràpies per tractar es veuen reduïdes. Aquest és el cas de les quinolones, que tot i mostrar una bona activitat per tractar la DV, en determinades regions, com per exemple la Índia, ja no són efectives. Per aquest motiu calia buscar alternatives com podria ser la RFX.

En aquest estudi es va testar l'activitat *in vitro* de la RFX en 84 *E. coli* i 11 *Shigelles* aïllades en pacients amb DV. S'avaluà la CMI a RFX i a altres antimicrobians usats com a teràpia en DV (ampicil·lina, cloranfenicol, tetraciclina, cotrimoxazole, àcid nalidíxic i ciprofloxacina).

Els resultats mostraren que la RFX posseïa una bona activitat *in vitro* en tots els patògens testats. Aixi, cap aïllat no presentava una CMI superior a 32 mg/L. Els valors de resistència als altres antimicrobians fou elevat, només en el cas de les quinolones i el cloramfenicol s'obtingueren valors raonables dins del grup dels antibiòtics usats

convencionalment per tractar aquesta patologia. En el cas de l'àc. nalidíxic, en soques EAEC, s'arribà a un 20,9% de resistència, mentre que en el cas de cirpofloxacina s'arribà a un 9.7% en ETEC.

Vist que la resistència als antibiòtics convencionals del tractament de la DV està en augment, i que les soques resistents a ac. nalidíxic són més sensibles d'adquirir resistència a d'altres fluoroquinolones, es proposa la RFX com a bona alternativa per al tractament de la DV, o de patògens entèrics en general. Sobretot en països on la resistència a quinolones és molt elevada, com és el cas del subcontinent Índi i especialment al ser aquest un antibiòtic no absorbible a nivell intestinal.

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 59 (2007) 473–475
DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE
www.elsevier.com/locate/diagmicrobio

In vitro antimicrobial activity of rifaximin against enteropathogens causing traveler's diarrhea

Joaquim Ruiz[a,*], Laura Mensa[a], Cristina O'Callaghan[a], Maria J. Pons[a], Ana González[a], Jordi Vila[b], Joaquim Gascón[a]

[a]*Hospital Clinic, Centro de Salud Internacional (CRESIB); IDIBAPS, Universitat de Barcelona, 08036-Barcelona, Spain*
[b]*Hospital Clinic, Servei de Microbiologia; IDIBAPS, Universitat de Barcelona, 08036-Barcelona, Spain*

Received 14 May 2007; accepted 6 July 2007

Abstract

The in vitro activity of rifaximin against 84 diarrheagenic *Escherichia coli* and 11 *Shigella sonnei* causing traveler's diarrhea was evaluated. The MIC of rifaximin ranged between <0.007 and 32 mg/L; other agents tested had an MIC of >256 mg/L in most cases. The results showed the potential use of rifaximin to treat these infections.
© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Rifaximin; Traveler's diarrhea; EAEC; ETEC; *Shigella sonnei*

Traveler's diarrhea (TD) is the most common pathology affecting travelers returning from tropical areas. The main etiologic causes of TD are of bacterial origin, and among these, the most prevalent are the diarrheagenic *Escherichia coli* (mainly enteroaggregative and enterotoxigenic *E. coli*), followed by *Shigella* spp. (Gascón, 2006). TD is a self-limited illness and typically does not require antibiotic treatment. However, antibiotics may be necessary depending on the duration and severity of disease/symptoms, or in special circumstances. The most common antibiotic treatment is with fluoroquinolones; other agents such as cotrimoxazole, amoxicillin plus clavulanic acid, azithromycin, or erythromycin are also frequently used (Castelli et al., 2006; Ruiz et al., 2007).

The poor hygienic conditions found in many developing countries, limited antibacterial treatment options, inadequate laboratory facilities, and, in some cases, fraudulent compounds (Hart and Kariuki, 1998; Radyowijati and Haak, 2003) have resulted in high levels of antimicrobial resistance to ampicillin, cotrimoxazole, and tetracycline, among others (Mandomando et al., 2007; Navia et al., 1999; Pazhani et al., 2005).

Quinolones have retained a good activity against TD pathogens because of their higher economic cost that has restricted their use in low-income countries. However, in recent years, there has been a continuous increase in the number of enteropathogens causing TD that present quinolone resistance, especially, although not limited to, microorganisms originating in the Indian subcontinent (Vila et al., 2001; Ruiz et al., 2007; Weill et al., 2006). A possible reduction in the effectiveness of quinolones underscores the importance and urgency of finding novel therapeutic alternatives. Among these, rifaximin, a nonabsorbable rifamycin-derivative agent, has been proposed (Al-Abri et al., 2005).

This study aimed to analyze the rifaximin activity against 95 enteropathogens causing TD compared with the activity of 6 other antimicrobial agents. The study included 84 diarrheagenic *E. coli* (43 enteroaggregative *E. coli* [EAEC] and 41 enterotoxigenic *E. coli* [ETEC]) and 11 *Shigella sonnei* isolated from the feces of patients with TD attending the Tropical Disease Unit of the Hospital Clinic of Barcelona, Spain, during 2004 and 2005. In all cases, TD was defined according Merson's criteria (Merson et al., 1976).

The microorganisms were identified by conventional biochemical methods (Murray et al., 1995), and a specific polymerase chain reaction was performed to establish the

* Corresponding author. Tel.: +34-932275400x3388; fax: +34-932279853.
E-mail address: joruiz@clinic.ub.es (J. Ruiz).

0732-8893/$ – see front matter © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.diagmicrobio.2007.07.003

Table 1
Range, MIC_{50}, MIC_{90}, and levels of resistance

	EAEC (43)[a]	ETEC (41)[a]	*S. sonnei* (11)[a]
Rifaximin[b]			
Range[c]	0.5 to 32	0.5 to 32	2 to 8
MIC_{50}[c]	8	4	8
MIC_{90}[c]	32	16	8
Ampicillin			
Range	0.125 to >256	0.125 to >256	0.125 to >256
MIC_{50}	256	256	0.25
MIC_{90}	>256	>256	128
%*R*	85.4	63.4	36.3
Chloramphenicol			
Range	0.06 to >256	<0.007 to 256	0.125 to 2
MIC_{50}	4	1	0.25
MIC_{90}	256	128	1
%*R*	23.2	14.6	0.0
Tetracycline			
Range	0.125 to 256	0.06 to >256	0.125 to 128
MIC_{50}	128	128	64
MIC_{90}	256	256	128
%*R*	69.8	63.4	81.8
Cotrimoxazole			
Range	<0.007 to >256	<0.007 to >256	0.125 to >256
MIC_{50}	>256	>256	>256
MIC_{90}	>256	>256	>256
%*R*	62.8	63.4	81.8
Nalidixic acid			
Range	0.06 to >256	0.06 to >256	0.5 to 128
MIC_{50}	2	2	0.5
MIC_{90}	256	>256	16
%*R*	20.9	17.1	9.1
Ciprofloxacin			
Range	<0.007 to >256	<0.007 to >256	<0.007 to 0.5
MIC_{50}	<0.007	<0.007	<0.007
MIC_{90}	0.03	0.25	<0.007
%*R*	9.3	9.7	0.0

[a] Number of isolates.
[b] The CLSI does not dispose of resistance break point for rifaximin.
[c] Range, MIC_{50}, and MIC_{90} are expressed in milligrams per liter.

diarrheagenic characteristic of the *E. coli* isolates (Vargas et al., 1998). In vitro activity of rifaximin was evaluated as previously described (Sierra et al., 2001). *E. coli* strains with a known rifaximin MIC were used as control. The susceptibility to ampicillin, chloramphenicol, cotrimoxazole, tetracycline, nalidixic acid, and ciprofloxacin was established by agar dilution method (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 2006).

The results showed that rifaximin possesses a good activity against all tested isolates. No isolate had an MIC of rifaximin higher than 32 mg/L. The MIC_{50} of rifaximin ranged between 4 and 8 mg/L, whereas the MIC_{90} ranged between 8 and 32 mg/L. The MIC_{50} of ampicillin for the analyzed diarrheagenic *E. coli* was higher than 256 mg/L, whereas *S. sonnei* presented an MIC_{50} of 0.25 mg/L. The MIC_{90} of ampicillin ranged between 128 mg/L (*S. sonnei*) and >256 mg/L (diarrheagenic *E. coli*). For cotrimoxazole and tetracycline, the MIC_{50} was even higher than the established resistance break point (CLSI, 2006). The activity levels of quinolones and chloramphenicol were the best among the group of conventional antibacterial agents. Resistance levels to nalidixic acid ranged between 9.1% (*S. sonnei*) and 20.9% (EAEC), whereas those for ciprofloxacin ranged between 0.0% (*S. sonnei*) and 9.7% (ETEC). In the case of chloramphenicol, the resistance levels among diarrheagenic *E. coli* were 14.6% (ETEC) and 23.2% (EAEC). No *S. sonnei* presenting resistance to chloramphenicol was detected (Table 1). This finding is in accordance with the results previously described in the literature (Navia et al., 1999; Ahmed et al., 2006).

Rifaximin is able to attain intestinal concentrations ranging between 4000 and 8000 μg/g in feces when used in therapeutic conditions (800 mg divided into 2 oral administrations) (Jiang et al., 2000). This represents a concentration more than 10 times higher than the highest MIC found in our study. It has been described that antimicrobial agents' fecal concentrations may not reflect their bioavailability in the mucosal surfaces (Wiuff et al., 2002). Thus, in vitro obtained MICs may not accurately predict antibacterial activity. However, the present data, together with different reports showing excellent curation rates (Ericsson and DuPont, 2005), suggest that, in the mucosal surface, rifaximin is able to reach concentration levels consistently higher than in vitro reported MICs.

Different authors have shown that the levels of antimicrobial resistance of TD-causing pathogens to the conventional agents tested in this study were extremely high, reaching, in some cases, levels greater than 80% (Sierra et al., 2001; Vila et al., 2001; Wilson et al., 2002). In the case of quinolones, Enterobacteriaceae that presents resistance to nalidixic acid but susceptibility to fluoroquinolones can more easily acquire resistance to fluoroquinolones (Ruiz et al., 2002), a possible consequence being therapeutic failures (Khan et al., 1997; Wain et al., 1997). The present work detected significant levels of resistance to nalidixic acid, which exceed 20% in the case of EAEC. These results highlight the high risk of therapeutic failures associated with the empiric use of ciprofloxacin.

The nonabsorbable nature of rifaximin prevents its use in treating systemic infections but confers a great potential for consideration as an alternative and 1st-line treatment for a series of digestive pathologies associated with Gram-negative microorganisms such as diarrheagenic *E. coli*. This is particularly relevant for cases imported from areas where quinolone resistance is common, such as the Indian subcontinent (Pazhani et al., 2005; Taneja, 2007).

In vitro MIC levels of other diarrheagenic microorganisms to rifaximin had a similar range of values to those found in the present study (Sierra et al., 2001; Scrascia et al., 2003), with the exception of *Campylobacter* spp. and *Yersinia enterocolitica*, which may present MICs levels of 128 mg/L or higher (Sierra et al., 2001). We also analyze the rifaximin MIC of a limited number of other enteropathogens (6 *Salmonella* spp. and 4 *Shigella flexneri*), and in any case, an MIC of rifaximin higher than 8 mg/L was observed (data not shown).

Although the present study observed an excellent in vitro activity of rifaximin against *S. sonnei*, these results should be taken cautiously because the invasive characteristic of this microorganism (Niyogi, 2005) may result in reduced in vivo action of rifaximin because of its aforementioned nonabsorbable nature. However, it is worth mentioning that rifaximin activity in empiric TD treatments against infections by *S. sonnei* has been observed (Huang and DuPont, 2005).

In summary, the results presented demonstrate the potential role that rifaximin might play as an effective treatment option for the main etiologic causes of TD, especially in cases where quinolone resistance is suspected.

Acknowledgments

Dr. Ruiz is a recipient from grant CP05/0130 from Fondo de Investigaciones Sanitarias. JV research is supported by grants FIS05/0068 from Fondo de Investigaciones Sanitarias and SGR050444 from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya.

This work was also partially supported by project RICET-C03/04 and by Laboratorios BamaGeve. The Centro the Salud Internacional is also supported by the RCESP.

References

Ahmed AM, Furuta K, Shimomura K, Kasama Y, Shimamoto T (2006) Genetic characterization of multidrug resistance in *Shigella* spp. from Japan. *J Med Microbiol* 55:1685–1691.

Al-Abri S, Beeching NJ, Nye FJ (2005) Traveller's diarrhoea. *Lancet Infect Dis* 5:349–360.

Castelli F, Saleri N, Tomasoni LR, Carosi G (2006) Prevention and treatment of traveler's diarrhea. *Digestion* 73(Suppl 1):109–118.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2006) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Sixteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S16. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Ericsson CD, Dupont HL (2005) Rifaximin in the treatment of infectious diarrhea. *Chemotherapy* 51(Suppl 1):73–80.

Gascón J (2006) Epidemiology, etiology and pathophysiology of traveler's diarrhea. *Digestion* 73(Suppl 1):102–108.

Hart CA, Kariuki S (1998) Antimicrobial resistance in developing countries. *BMJ* 317:647–650.

Huang DB, DuPont HL (2005) Rifaximin—a novel antimicrobial for enteric infections. *J Infect* 50:97–106.

Jiang ZD, Ke S, Palazzini E, Riopel L, DuPont H (2000) In vitro activity and fecal concentration of rifaximin after oral administration. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2205–2206.

Khan WA, Seas C, Dhar U, Salam MA, Bennish ML (1997) Treatment of shigellosis: V. Comparison of azithromycin and ciprofloxacin. *Ann Intern Med* 126:697–703.

Mandomando IM, Macete EV, Ruiz J, Sanz S, Abacassamo F, Vallés X, Sacarlal J, Vila J, Navia MM, Alonso PL, Gascón J (2007) Etiology of diarrhea in children younger than 5 years of age admitted in a rural hospital of southern Mozambique. *Am J Trop Med Hyg* 76:522–527.

Merson MH, Morris GK, Sack DA, Wells JG, Feeley JC, Sack RB, Creech WB, Kapikian AZ, Gangarosa EJ (1976) Travelers' diarrhea in Mexico. A prospective study of physicians and family members attending a congress. *N Engl J Med* 294:1299–1305.

Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, Eds (1995) Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington, DC: ASM Press.

Navia MM, Capitano L, Ruiz J, Vargas M, Urassa H, Schellemberg D, Gascón J, Vila J (1999) Typing and characterization of the mechanisms of resistance in *Shigella* sp. isolated from faeces of children in Ifakara (Tanzania). *J Clin Microbiol* 37:3113–3117.

Niyogi KS (2005) Shigellosis. *J Microbiol* 43:133–143.

Pazhani GP, Ramamurthy T, Mitra U, Bhattacharya SK, Niyogi SK (2005) Species diversity and antimicrobial resistance of *Shigella* spp. isolated between 2001 and 2004 from hospitalized children with diarrhoea in Kolkata (Calcutta), India. *Epidemiol Infect* 133:1089–1095.

Radyowijati A, Haak H (2003) Improving antibiotic use in low-income countries: an overview of evidence on determinants. *Soc Sci Med* 57:733–744.

Ruiz J, Gómez J, Navia MM, Ribera A, Sierra JM, Marco F, Mensa J, Vila J (2002) High prevalence of nalidixic acid resistant, ciprofloxacin susceptible phenotype among clinical isolates of *Escherichia coli* and other Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* 42:257–261.

Ruiz J, Marco F, Oliveira I, Vila J, Gascón J (2007) Trends in antimicrobial resistance levels among *Campylobacter* spp. causing traveler's diarrhea. *APMIS* 115:218–224.

Scrascia M, Forcillo M, Maimone F, Pazzani C (2003) Susceptibility to rifaximin of *Vibrio cholerae* strains from different geographical areas. *J Antimicrob Chemother* 52:303–305.

Sierra JM, Ruiz J, Navia MM, Vargas M, Gascon J, Vila J (2001) In vitro activity of rifaximin over enteropathogens producing traveler's diarrhea. *Antimicrob Agents Chemother* 47:643–644.

Taneja N (2007) Changing epidemiology of shigellosis and emergence of ciprofloxacin-resistant Shigellae in India. *Antimicrob Agents Chemother* 45:678–679.

Vargas M, Gascon J, Gallardo F, Jimenes de Anta MT, Vila J (1998) Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains detected by PCR in patients with travelers' diarrhea. *Clin Microbiol Infect* 4:628–682.

Vila J, Vargas M, Ruiz J, Espasa M, Pujol M, Corachan M, Jiménez de Anta MT, Gascón J (2001) Susceptibility patterns of enteroaggregative *Escherichia coli* associated to traveller's diarrhoea. Emergence of quinolone resistance. *J Med Microbiol* 50:996–1000.

Wain J, Hoa NT, Chinh NT, Vinh H, Everett MJ, Diep TS, Day NP, Solomon T, White NJ, Piddock LJ, Parry CM (1997) Quinolone-resistant *Salmonella typhi* in Viet Nam: molecular basis of resistance and clinical response to treatment. *Clin Infect Dis* 25:1404–1410.

Weill FX, Bertrand S, Guesnier F, Baucheron S, Cloeckaert A, Grimont PA (2006) Ciprofloxacin-resistant *Salmonella* Kentucky in travelers. *Emerg Infect Dis* 12:1611–1612.

Wilson A, Evans J, Chart H, Cheasty T, Wheeler JG, Tompkins D, Smith HR (2002) Characterisation of strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated during the infectious intestinal disease study in England. *Eur J Epidemiol* 17:1125–1130.

Wiuff C, Lykkesfeldt J, Aarestrup FM, Svendsen O (2002) Distribution of enrofloxacin in intestinal tissue and contents of healthy pigs after oral and intramuscular administrations. *J Vet Pharmacol Ther* 25:335–342.

ARTICLE 6

Development of *Escherichia coli* rifaximin-resistant mutants: frequency of selection and stability.

Desenvolupament de mutants d'*Escherichia coli* resistents: freqüència de selecció i estabilitat.

Ruiz J, Mensa L, **Pons MJ**, Vila J, Gascon J.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2008 May;61(5):1016-9.

RESUM

La RFX, degut a la seva bona activitat *in vitro* enfront a patògens intestinals i la seva característica de no ésser absorbible a nivell del tracte intestinal, s'ha proposat com una alternativa per la diarrea.

En aquest estudi es volgué seleccionar mutants resistents a RFX d'*E. coli* amb l'objectiu d'establir la freqüència de mutació, si hi havia possible resistència creuada amb altres agents antimicrobians i l'estabilitat de la resistència als mutants obtinguts.

S'utilitzaren 4 aïllats d'*E. coli* (2 EAEC i 2 ETEC) per tal d'obtenir mutants resistents a la RFX. La freqüència de mutació en presència de RFX, rifampicina i ciprofloxacina va ser establerta pel creixement en plaques que contenien dilucions seriades dels antibiòtics corresponents sempre per sobre de la CMI bacteriana.

Per determinar l'estabilitat de la resistència a la RFX, es van seleccionar els mutants resistents a la RFX i es van cultivar durant 20 cultius consecutius en plaques lliures d'antibiòtics. Cada 10 dies, s'establí de nou la CMI de la RFX, cloramfenicol, àc. nalidíxic i ciprofloxacina .

Els resultats més destacats d'aquest estudi foren:

- La freqüència de mutació en presència de RFX oscil·là entre $5,7x10^{-7}$ i $1,6x10^{-8}$ en els casos de les soques d'ETEC, i entre $2,0x10^{-8}$ i $9,3\ x10^{-8}$ per als casos de EAEC.
- En general la freqüència de mutació en presència de rifampicina va ser de l'ordre de 10^{-8} i no es van aconseguir obtenir mutants en presència de ciprofloxacina.
- Vint dels 28 mutants seleccionats exhibien nivells de resistència al voltant o per sobre de 256 mg / L.
- Al observar l'estabilitat de les mutacions en el temps, en tots els casos, la resistència era estable, i no es va observar cap reversió cap a les CMI parendals originals.
- No es va observar resistència creuada amb cap dels antimicrobians testats, ja que les CMI de cloramfenicol, àc. nalidíxic o ciprofloxacina no es van veure afectades.

Aquest estudi molecular ens va donar informació *in vitro*, sobre la RFX i la seva selecció de mutants. Es va observar que la RFX tenia un baix nivell de selecció de resistències, encara que quan aquestes es seleccionen, es creen en un sol pas, són elevades i altament estables en el temps.

La recomanació fou que calia una vigilància periòdica dels nivells de resistència a la RFX, per detectar la possible aparició d'aïllats clínics resistents a aquest antibiòtic. D'aquesta manera es proposaren altres estudis que caracteritzessin en profunditat les soques mutants obtingudes per establir els mecanismes moleculars implicats en l'aparició d'aquestes resistència.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2008) **61**, 1016–1019
doi:10.1093/jac/dkn078
Advance Access publication 5 March 2008

JAC

Development of *Escherichia coli* rifaximin-resistant mutants: frequency of selection and stability

Joaquim Ruiz[1]*, Laura Mensa[1], Maria J. Pons[1], Jordi Vila[2] and Joaquim Gascon[1]

[1]*Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona (CRESIB), Hospital Clinic/IDIBAPS, C/Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain;* [2]*Servicio de Microbiologia, Hospital Clinic/IDIBAPS, C/Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain*

Received 8 September 2007; returned 30 October 2007; revised 17 January 2008; accepted 31 January 2008

***Objectives*: To select rifaximin-resistant mutants of *Escherichia coli* and to establish the frequency of mutation, cross-resistance with other antimicrobial agents and the stability of the mutants obtained.**

***Methods*: Four *E. coli* isolates [two enteroaggregative *E. coli* (EAEC) and two enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)] were used to obtain rifaximin-resistant mutants. The frequency of mutation in the presence of rifaximin, rifampicin and ciprofloxacin was established by growth on plates containing serial dilutions of antibiotic above the bacterial MIC. To determine the stability of rifaximin resistance, 28 selected resistant mutants were grown for 20 consecutive cultures on antibiotic-free plates. Every 10 days, the MICs of rifaximin, chloramphenicol, nalidixic acid and ciprofloxacin were established.**

***Results*: The frequency of mutation in the presence of rifaximin ranged between 5.7×10^{-7} and 1.6×10^{-6} in the case of the ETEC isolates, and between 2.0×10^{-8} and 9.3×10^{-8} in the case of the EAEC isolates; the frequency of mutation in the presence of rifampicin was in the order of 10^{-8} and no mutant in the presence of ciprofloxacin was obtained. Twenty-six out of 28 selected mutants exhibited resistance levels around or higher than 256 mg/L. In all cases, the resistance was stable, and no reversion towards the original parental MIC was observed. In no case was the MIC of chloramphenicol, nalidixic acid or ciprofloxacin affected.**

***Conclusions*: Rifaximin has a low level of resistance selection, although it may select stable highly resistant mutants in a single step. Periodical surveillance of the levels of rifaximin resistance is required to detect the possible appearance of rifaximin-resistant clinical isolates. Further studies to characterize in-depth the mechanisms of stable resistance to rifaximin are necessary.**

Keywords: frequency of mutation, diarrhoea, non-absorbable antibiotics

Introduction

Rifaximin is a non-absorbable rifamycin derivative agent. Although this characteristic has classically been considered as a limitation, it has been proposed as an alternative to the current therapeutic schedules for some digestive infections, such as the traveller's diarrhoea (TD).[1] In fact, due to this characteristic, rifaximin has no-systemic involvement, does not alter the microbiota population (other than those based in the intestinal area) and presents high concentrations in the intestinal lumen, higher than the usual MICs described *in vitro* for the main enteropathogens.[2] Another proposed goal associated with the use of this agent is the possibility of reserving other antimicrobial agents, which are able to be used to treat systemic infections, such as the fluoroquinolones that are currently used as first-line drugs in the treatment of TD, diminishing their pressure on the microorganisms, thereby minimizing their ecological impact and favouring a lower selection of quinolone-resistant strains. However, no study has been performed regarding the potential of rifaximin to select resistant mutants, and its possible effect on the activity of other antimicrobial agents has not been established. Resistance to antimicrobial agents is one of the main problems related to the current use of antibiotics. Thus, the ability of antimicrobial agents to lead to the development of resistant mutants, their effect on the susceptibility levels of other antimicrobial agents and the stability of the mutants are relevant factors that must be established to determine the therapeutic value of novel antibacterial agents.

*Corresponding author. Tel: +34-932275400, ext. 3388; Fax: +34-932279853; E-mail: joruiz@clinic.ub.es

© The Author 2008. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oxfordjournals.org

Characterization of rifaximin-resistant mutants

The aim of this study was to obtain rifaximin-resistant mutants *in vitro* and establish the frequency of mutation, the possible cross-resistance with other agents and the stability of the acquired resistance.

Materials and methods

Microorganisms

Four diarrhoeic *Escherichia coli* clinical isolates [two enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) and two enteroaggregative *E. coli* (EAEC)] recovered as a cause of TD were included in this study. The isolates were identified by conventional biochemical methods, while the diarrhoeic character (presence of the gene encoding the LT toxin, as well as presence of the pAA plasmid) was determined by PCR as described previously.[2]

Antibacterial susceptibility levels

The MICs of chloramphenicol, nalidixic acid, ciprofloxacin (Sigma, St Louis, MO, USA) and rifaximin (Bama-Geve, Barcelona, Spain) were determined by agar dilution methodology.[2,3] *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 were used as quality controls.

Determination of spontaneous single-step resistance rates

To determine the spontaneous single-step resistance rates, one colony of the selected strains was grown overnight on brain heart infusion (Becton–Dickinson, Le Pont de Claix, France). Aliquots of 100 μL were directly spread onto Mueller–Hinton (Becton Dickinson) plates containing rifaximin at 8, 16, 32, 64 and 128 mg/L (equivalent to 1×, 2×, 4×, 8× and 16× MIC). Simultaneously, serial dilutions designed to calculate the size of the original inoculum was performed. The plates were read at 24 h. The initial inocula as well as the frequency of spontaneous resistance selected with rifaximin were calculated as described previously.[4] The experiments were repeated four times, and the frequency of mutation considered was the mean of the experiments. Additionally, the frequency of mutation in the presence of rifampicin and ciprofloxacin was established following the same methodology.

Stability of the selected rifaximin-resistant mutants

Twenty-eight resistant *E. coli* mutants were selected from the plates used to determine the mutation frequency in the presence of rifaximin. These strains were grown in Mueller–Hinton medium in the absence of antibiotic pressure for 20 consecutive cultures. Every 10 days, the MICs of all the antibacterial agents included in this study were determined.

Results

The frequency of selection of rifaximin-resistant mutants ranged between 5.7×10^{-7} and 1.6×10^{-6} in the case of the ETEC strains, and between 2.0×10^{-8} and 9.3×10^{-8} in the case of the EAEC isolates (Table 1). The frequency of mutation of each strain was independent of the antibiotic concentration in the plates (Table 1). No *in vitro* ciprofloxacin-resistant mutants were obtained, while the frequency of mutation in the presence of rifampicin was in the order of 10^{-8} (Tables 2 and 3).

Table 1. Frequencies of mutation: rifaximin

Strain	Pathotype	MIC (mg/L)	Mutation frequency[a]				
			8 mg/L[b]	16 mg/L[b]	32 mg/L[b]	64 mg/L[b]	128 mg/L[b]
19768	ETEC	8	4.5×10^{-7}	1.2×10^{-7}	1.5×10^{-7}	1.3×10^{-7}	1.3×10^{-7}
19769	ETEC	8	1.6×10^{-6}	5.7×10^{-7}	3.7×10^{-7}	1.2×10^{-6}	5.2×10^{-7}
21835	EAEC	8	5.7×10^{-8}	2.6×10^{-8}	2.7×10^{-8}	2.6×10^{-8}	2.5×10^{-8}
23233	EAEC	8	9.3×10^{-8}	5.2×10^{-8}	4.1×10^{-8}	2.6×10^{-8}	2.0×10^{-8}

[a]The mutation frequency is expressed as the mean of four different experiments.
[b]Antibiotic concentration in the selective plates.

Table 2. Frequencies of mutation: rifampicin

Strain	Pathotype	MIC (mg/L)	Mutation frequency[a]			
			8 mg/L[b]	16 mg/L[b]	32 mg/L[b]	64 mg/L[b]
19768	ETEC	16	—	3.6×10^{-8}	3.6×10^{-8}	1.1×10^{-8}
19769	ETEC	16	—	6.6×10^{-8}	5.5×10^{-8}	4.3×10^{-8}
21835	EAEC	16	—	2.0×10^{-8}	1.3×10^{-8}	2.6×10^{-8}
23233	EAEC	32	—	—	3.2×10^{-8}	1.2×10^{-8}

[a]The mutation frequency is expressed as the mean of four different experiments.
[b]Antibiotic concentration in the selective plates.

Table 3. Frequencies of mutation: ciprofloxacin

Strain	Pathotype	MIC (mg/L)	Mutation frequency[a]	
			0.25 mg/L[b]	1 mg/L[b]
19768	ETEC	<0.007	$<1.0 \times 10^{-8}$	$<1.0 \times 10^{-8}$
19769	ETEC	<0.007	$<1.1 \times 10^{-8}$	$<1.1 \times 10^{-8}$
21835	EAEC	<0.007	$<1.0 \times 10^{-8}$	$<1.0 \times 10^{-8}$
23233	EAEC	<0.007	$<1.2 \times 10^{-8}$	$<1.2 \times 10^{-8}$

[a]The mutation frequency is expressed as the mean of four different experiments.
[b]Antibiotic concentration in the selective plates.

Twenty-eight resistant mutant strains were selected to analyse the levels and stability of acquired rifaximin resistance, as well as the possible presence of cross-resistance with another agents. Only two of the selected mutants (strains 11 and 14) presented a low/moderate stable resistance level of 32–64 mg/L. The remaining mutants consistently presented rifaximin MIC levels ≥256 mg/L. After 20 consecutive cultures on plates without antibiotic pressure, reversion of rifaximin resistance towards the parental MICs was not observed (Table 4).

No alteration was observed in the MICs of nalidixic acid, ciprofloxacin and chloramphenicol at any time. Thus, in all cases, the MIC of ciprofloxacin was lower than 0.007 mg/L, whereas that of nalidixic acid and chloramphenicol ranged between 0.5 and 2 mg/L, and between 0.5 mg/L and 4 mg/L, respectively. No differences higher than 4× between parental strains and their respective obtained mutants were observed.

Discussion

The ability of an antimicrobial agent to select resistance is a relevant factor that affects its usefulness and may diminish its useful life. In our case, the frequency of mutation ranged between 10^{-6} and 10^{-8}. In the case of EAEC, the frequency of mutation in the presence of rifaximin was similar to that established in the present study for rifampicin, whereas in the case of ETEC, the frequency of mutation in the presence of rifaximin was slightly higher than those frequencies described for rifampicin both in the present study and in the literature.[5] In both EAEC and ETEC, the frequency of mutation in the presence of rifaximin was slightly higher than that established for ciprofloxacin.[5]

In all cases, ciprofloxacin selects mutants at a lower frequency than rifaximin and rifampicin. However, it is worth mentioning that all the isolates presented an MIC of ciprofloxacin lower than 0.007 mg/L. Thus, it is possible that the selection plates presented excessive ciprofloxacin concentrations in comparison with the other agents analysed.

The rifaximin-resistant mutants obtained were stable and did not revert when the selection pressure disappeared, suggesting the presence of chromosomal mutations, probably in the *rpoB* gene, as has been described for rifampicin and other derivatives of rifamycin.[6] However, other possibilities should be considered, such as the stable deregulation of efflux systems due to different factors such as the presence of mutations or stable alterations (i.e. insertion of an IS or transposons) in their promoter regions.[7] Obviously, mutations in the *rpoB* gene or deregulations of efflux pumps, as well as other possible alterations, may be present together (studies in development).

The fact that 26 out of 28 analysed mutants presented a stable rifaximin MIC of around 256 mg/L or higher, irrespective of the rifaximin concentration present in the plate on which they were selected, together with the absence of differences in the selection rates among the different selective plates, suggests that these high resistance levels may be related to a single mutation step. Thus, despite the high intestinal concentrations of rifaximin, of up to 8000 μg/g in faeces,[1] rifaximin should be used with caution, because of the possibility of developing rifaximin resistance during treatment, which may result in both therapeutic failure and the spread of stable rifaximin-resistant strains. In order to evaluate the real risk in clinical practice, the availability of rifaximin in the intestinal mucosal surfaces should be determined.

Table 4. Stability of the obtained rifaximin-resistant mutants

Strain	Selection[a]	MIC of rifaximin (mg/L)		
		1[b]	10	20
19768-ETEC	parental	8	8	8
1	32	>256	64	128
2	32	>256	128	128
3	64	>256	>256	>256
4	64	256	128	256
5	128	>256	>256	>256
6	128	>256	>256	256
19769-ETEC	parental	8	8	4
7	16	256	256	>256
8	32	>256	>256	>256
9	32	256	256	64
10	64	256	256	>256
11	64	64	64	64
12	128	256	256	>256
13	128	>256	128	>256
21835-EAEC	parental	8	8	4
14	16	64	32	32
15	32	>256	>256	>256
16	32	>256	>256	256
17	64	>256	>256	>256
18	64	>256	>256	>256
19	128	>256	>256	>256
20	128	>256	>256	>256
23233-EAEC	parental	8	8	32
21	16	256	256	256
22	32	>256	>256	>256
23	32	256	128	>256
24	64	>256	>256	>256
25	64	>256	>256	>256
26	64	256	256	>256
27	128	>256	>256	>256
28	128	256	256	>256

[a]Rifaximin concentration in the selective plates expressed in mg/L.
[b]Culture day.

Only 2 out of 28 mutant strains (strains 11 and 14) exhibited a slight but stable increase in the rifaximin MIC. In the case of other antibacterial agents, such as quinolones, it has been described that different specific substitutions in their targets may result in different levels of resistance.[8] The differences observed in the present study may be the result of a similar phenomenon. Furthermore, as mentioned previously, the presence of a stable deregulation of an efflux pump or the presence of stable alterations in the outer membrane cannot be ruled out.

The results obtained show that neither stable nor unstable quinolone-resistant or quinolone-intermediate mutants were obtained. This is of special interest, since the presence of diminished susceptibility to quinolones is a risk factor for developing full resistance that may be related to therapeutic failure.[9] Additionally, the lack of effect on the MICs of quinolones and chloramphenicol suggests that rifaximin does not act by diminishing the expression level of the OmpF porin or overexpressing the AcrAB-TolC efflux pump. Thus, at least in the mutants analysed, rifaximin does not act on *marRAB* or other similar multiresistant regulation systems.[10]

In summary, this study describes the low levels of resistance selection by rifaximin, but the possibility of selecting highly resistant mutants in a single step. Although rifaximin is a promising alternative in the treatment of diarrhoeal infections, periodic surveillance is required to detect the possible appearance of clinical isolates exhibiting resistance. Further studies designed to establish the bioavailability of rifaximin in the mucosal surfaces as well as to characterize the mechanisms of stable resistance to rifaximin in-depth are necessary, since selection of rifaximin-resistant mutants during normal rifaximin treatment may result in therapeutic failure.

Funding

J. R. is the recipient of grant CP05/0130 from Fondo de Investigaciones Sanitarias. The research of J. V. is supported by grant 2005 SGR00444 from the Department d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya, Spain. This study was also funded by Laboratorios Bama-Geve.

Transparency declarations

The sponsor of the study (Bama-Geve) had no role in study design, data collection, data interpretation or writing the report. J. R. had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication. We declare that we have no conflict of interest.

References

1. Jiang ZD, Ke S, Palazzini E *et al*. *In vitro* activity and fecal concentration of rifaximin after oral administration. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 2205–6.

2. Ruiz J, Mensa L, O'Callaghan C *et al*. *In vitro* antimicrobial activity of rifaximin against enteropathogens causing traveler's diarrhea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; **59**: 473–5.

3. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Sixteenth Informational Supplement M100-S16*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2006.

4. Ruiz J, Jurado A, Garcia-Méndez E *et al*. Frequency of selection of fluoroquinolone resistant mutants of *Neisseria gonorrhoeae* exposed to gemifloxacin and four other quinolones. *J Antimicrob Chemother* 2001; **48**: 545–8.

5. Miller K, O'Neill AJ, Chopra I. Response of *Escherichia coli* hypermutators to selection pressure with antimicrobial agents from different classes. *J Antimicrob Chemother* 2002; **49**: 925–34.

6. Xu M, Zhou YN, Goldstein BP *et al*. Cross-resistance of *Escherichia coli* RNA polymerase conferring rifampin resistance to different antibiotics. *J Bacteriol* 2005; **1887**: 2763–92.

7. Piddock LJV. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2006; **19**: 382–402.

8. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA Gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 2003; **51**: 1109–17.

9. Ruiz J, Gómez J, Navia MM *et al*. High prevalence of nalidixic acid resistant, ciprofloxacin susceptible phenotype among clinical isolates of *Escherichia coli* and other Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; **42**: 257–61.

10. Randall LP, Woodward MJ. The multiple antibiotic resistance (*mar*) locus and its significance. *Res Vet Sci* 2002; **72**: 87–93.

ARTICLE 7

Fitness and molecular mechanisms of resistance to rifaximin in *in vitro* selected *Escherichia coli* mutants

"Fitness" i mecanismes moleculars de resistència *in vitro* a rifaximina en soques mutants d'*Echerichia coli*

Pons MJ, Mensa L, Gascón J, Ruiz J.

Microbial Drug Resistance. 2012 Aug;18(4):376-9.

RESUM

L'augment de les resistències a antibiòtics en general, i sobretot en Enterobacteris, fa que sigui clau buscar noves alternatives pel tractament de la diarrea. La RFX es considera una bona alternativa per tractar patògens intestinals que provoquen la diarrea.

L'objectiu d'aquest estudi és analitzar els mecanismes moleculars que contribueixen als desenvolupament de resistència a RFX en soques d'*E. coli*, a nivell d'*in vitro*.

En aquest estudi es van estudiar vint-i-vuit soques d'*E. coli* mutants resistents a RFX provinents de 4 soques *E. coli* aïllades de pacients amb diarrea del viatger.
La determinació del rol de les bombes d'expulsió en la resisistència fou determinat mitjançant l'ús de Phe-Arg-beta-naphthylamida (PAßN), un inhibidor de les bombes d'expulsió. S'observà el paper de les mutacions en el gen diana de la RFX, el gen *rpoB* realitzant la PCR i posterior seqüenciació d'un fragment de 1.057pb (que conté els 3 clusters on s'observen les pricipals mutacions en aquest gen).

Alhora es realitzà l'observació de possibles canvis en el nivell d'expressió de les porines tot extraient-les i realitzant gels d'acrilamida. Per observar la fitness es feu mitjançant corbes de creixement mesurades en a una densitat òptica de 600nm.

Els resultats més destacats d'aquest estudi foren:
No es van trobar canvis en la diana en un 25% (7/28) de les seqüències. Les substitucions en l'aminoàcid 516 de la subunitat beta de la RNA polimerasa van ser les trobades en major freqüència, un 53.6% dels mutants. En 15 soques s'han trobat els canvis ja descrits D516Y, D516N i D516G, i en 2 aïllats: H526N, H526L. Finalment en 2 soques més es descrigué el canvi T526R. Una soca amb el canvi S512F i un darrer amb S574Y. S'observà que l'inhibidor de bombes provoca un decreixement de la CMI en un 71.43% de les soques. No es van trobar diferències significatives en les corbes de creixement ni en l'expressió de porines descartant així el seu possible rol en l'aparició de resistències a RFX.

Els resultats mostren que el paper més important en l'aparició de resistència a RFX són les mutacions en la diana i/o la sobreexpressió de les bombes d'expulsió.

MICROBIAL DRUG RESISTANCE
Volume 00, Number 00, 2011
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/mdr.2011.0010

Fitness and Molecular Mechanisms of Resistance to Rifaximin in *In Vitro* Selected *Escherichia coli* Mutants

Maria J. Pons, Laura Mensa, Joaquim Gascón, and Joaquim Ruiz

Aims: This study sought to analyze the molecular mechanisms contributing to the development of rifaximin (Rfx) resistance *in vitro* in *Escherichia coli*. Twenty-eight Rfx-resistant mutants as well as four clinical isolates of *E. coli* were analyzed. The results obtained show that mutations in the *rpoB* gene and overexpression of Phe-Arg-β-naphthylamide (PAβN)-inhibitible efflux pump were implicated in Rfx resistance. ***Results:*** Amino acid substitutions at position 516 of the β-subunit of RNA polymerases were the most frequently obtained (53.6% of the mutants). The efflux pump inhibitor decreased the minimal inhibitory concentration (MIC) of 71.43% (20/28) of the mutant strains. ***Conclusions:*** Mutations studied in the *rpoB* gene and overexpression of PAβN-inhibitible efflux pumps contribute to Rfx resistance (together or not), whereas alterations in porin levels do not seem to have a relevant role in the acquisition of Rfx resistance.

Introduction

Diarrhea is the most common pathology affecting children in developing countries, causing high morbidity and mortality and the death of 1.9 million children under 5 years of age every year.[2] Additionally, this illness is the most frequent cause of morbidity among travelers (traveler's diarrhea [TD]) returning from tropical areas. A series of etiological causes have been described, being those of bacterial origin among the most relevant, with diarrheagenic *Escherichia coli* playing a main role.[3] Although TD is a self-limiting disease, the severity or duration of the symptoms may require the administration of antibiotic treatment. The most common therapeutic schedules include treatment with cotrimoxazole, amoxicillin plus clavulanic, azithromycin, or erythromycin, according to the specific pathogen isolated. However, the antimicrobial agents most frequently used are fluoroquinolones.[8]

Antibiotic resistance is an increasing problem worldwide. The particular characteristics of developing countries, such as the lack of adequate sanitation, lack of regulation of antimicrobial use, lack of microbiology facilities, frequent inadequate and unnecessary antibiotic treatments, limited antibacterial options, inadequate storage conditions, unfinished treatments, or fraudulent compounds among others, may result in high levels of resistance to the most commonly available antimicrobial agents such as cotrimoxazole, ampicillin, or tetracycline.[4] In addition, in some areas such as India, resistance to quinolones has emerged in the last years.[7] TD reflects the situation in these countries.[7–9] Thus, pathogens showing high antibiotic resistance profiles, including β-lactamases, quinolones, and others, have been described as a cause of TD.

This situation shows the need to develop studies in search of alternative treatments. Rifaximin (Rfx) is a semisynthetic derivative of rifamycin with *in vitro* activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. It is not absorbed in the intestinal tract because of its possession of an additional pyridoimidazole ring, thereby avoiding access to the systemic circulation.[5,12] The evidence published suggest that Rfx should be considered as an option for the treatment of uncomplicated TD and, in some countries, is used to treat other intestinal diseases. Rfx possesses a superior efficacy to placebo or loperamide and comparable efficacy to a systemically absorbed antibacterial, such as ciprofloxacin, in reducing the duration of illness, rapidly restoring wellness in most of patients, and thereby minimizing the interruption caused by TD.[6] However, Rfx is unlikely to be effective against invasive bacterial strains.[6] Rfx acts by binding to the beta subunit of RNA polymerase (encoded in the *rpoB* gene), suppressing the replication activity of genetic material.[5] Different mutations in the *rpoB* gene have been related to the acquisition of resistance to rifamycin derivatives such as rifampicin. These mutations are clustered in three highly conserved regions in the mid portion of the *rpoB* gene. Cluster I includes codons 505–537, cluster II codons 563–575,

Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona (CRESIB), IDIBAPS—Hospital Clinic-Universitat de Barcelona, Rosselló, Barcelona, Spain.

and cluster III has codons 684–690.[13,16] Efflux pumps or the presence of transferable mechanisms of resistance such as the *arr* genes have been also involved in resistance to rifamycin derivaties.[1] Thus, a possible co-selection of resistance by the use of unrelated agents cannot be ruled out. Different authors have studied the use of Rfx in the treatment of diarrheal infections, showing different properties such as *in vitro* or *in vivo* activity, pharmacokinetic parameters, or the ability to select *in vitro* resistant mutants.[9,10] Nonetheless, although mechanisms of resistance to the rifamycin derivates have been established, to our knowledge no study has been designed to analyze the mechanisms of resistance of Rfx in enterobacteriaceae.

The main aim of this study was to analyze the role of the Phe-Arg-β-naphthylamide (PAβN)-inhibitible efflux pumps, point mutations in the *rpoB* gene, and alterations in outer membrane porin proteins (Omp) composition in the development of Rfx resistance in *in vitro* obtained mutants of diarrheogenic *E. coli* and their effect on the bacterial fitness.

Methods

Bacterial strains

Twenty-eight previously obtained Rfx-resistant mutants[10] and their respective four original parental *E. coli* strains isolated from patients with TD were used in the study.

Determination of the role of efflux pump

To determine this, the efflux pump inhibitor PAβN was used. Antibacterial susceptibility levels of Rfx and Rfx plus PAβN (20 mg/L) were determined by agar dilution methodology as previously described.[10,11] Differences in the minimal inhibitory concentration (MIC) lesser than fourfold between MICs in the presence and absence of PAβN were considered as a methodological error and not an inhibitor effect.

Mutations in the rpoB

Mutations in the *rpoB* gene were determined by polymerase chain reaction (PCR) amplification of a fragment of 1,057 bp (containing clusters I, II, and III) in all the strains obtained using the following primers and conditions: 5′-AAG CTC ATC GAT ATC CGT AAC G-3′ and 5′-GCA CGT CGC CAC GTT CAA CC primers; 30 cycles at 94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec; and final elongation at 72°C for 10 min. The PCR product was recovered using a commercial kit (Wizard SV gel and PCR Clean-up system; Promega, Madison, WI) and sequenced (Macrogen, Seoul, Korea). The sequences were compared with a sequence consensus of GenBank No. CP000800.1. Alignments were made using the Bioedit program.

Porins

The porins were extracted using a methodology previously described.[14] Different expression levels of porins were determined with sodium dodecyl sulfate–urea–polyacrylamide gel electrophoresis 12% with urea 8 M. The electrophoresis conditions were 150 V and 40 mA.

The *E. coli* strains KAECF5 (OmpC−, OmpF−), KAEC5 (OmpC−, OmpF+), MH621 (OmpC+, OmpF−), and MKM505 (OmpC+, OmpF+) were used as control.

Growth rate measurements

Exponential doubling times were calculated by measuring the increase in optical density at 600 nm, OD_{600}, using a Genequant spectrophotometer. Growth in luria broth (LB) agar medium at 37°C in aerobic atmosphere was followed for 15 hr. The experiments were performed twice.

Results

Mutations in the rpoB *gene*

No parental strain presented differences with respect to the wild-type GenBank consensus sequence, showing a wild-type sequence.

The analysis of the *rpoB* gene sequences of the mutant strains showed that 25% (7/28) did not present any mutation in the region analyzed, but a single mutation was found in the remaining 21 strains (75%) (Table 1). Amino acid codon substitutions at position 516 of the β-subunit of RNA polymerases were most frequently obtained (15/28). These 15 strains presented amino acid D516Y, D516N, and D516G changes. Two different amino acid changes (2/28) were found at position 526 (H526N and H526L), and in two isolates (2/28), amino acid change T525R was found. Finally, amino acid changes S512F (1/28) and S574Y (1/28) were found in two different isolates.

Effect of the efflux pumps

PAβN presented an inhibitory effect decreasing the MIC of Rfx from 4- to ≥16-fold in 19 strains (67.9%). In 6 of these 19 strains, no mutations were detected in the *rpoB* gene, presenting a full reversion to the parental MIC levels in the presence of PAβN (Table 1).

Expression porins

The results did not show any difference between the expression levels of the porins and Omp A, C, and F in parental strains and Rfx mutants (data not shown).

Growth rate measurements

No significant differences were found in the growth measurements between strains (data not shown).

Overall

On analyzing the three mechanisms together, the overexpression of the PAβN-inhibitible efflux pumps in six mutants was able to explain the total resistance acquired. Mutations in the *rpoB* gene may explain high levels of resistance in eight mutants (28.6%), and the sum effect of at least two mechanisms could explain the resistance in the remaining mutants.

Discussion

The results of the present study suggest an overexpression of the PAβN-inhibitible efflux pumps, which together with target mutations play a relevant role in the development of Rfx resistance, but alterations in the OMPs were absent. However, other possible mechanisms of Rfx resistance such as the presence of efflux pumps non inhibitible by PAβN cannot be ruled out.

Table 1. Effect of Rifaximin Resistance Mechanisms

Strain	MIC Rfx	MIC Rfx+I	rpoB[a] Position	rpoB[a] Amino acid change
19768 parental	32	32	—	—
1	128	16	—	—
2	≥256	64	—	—
3	≥256	≥256	526	H → N
4	128	16	—	—
5	≥256	≥256	516	D → N
6	≥256	64	516	D → G
19769 parental	16	16	—	—
7	≥256	16	525	T → R
8	≥256	32	525	T → R
9	≥256	32	—	—
10	≥256	≥256	516	D → N
11	≥256	16	—	—
12	32	16	—	—
13	≥256	32	512	S → F
21835 parental	4	4	—	—
14	≥256	32	—	—
15	≥256	64	574	S → Y
16	≥256	≥256	516	D → Y
17	≥256	≥256	516	D → G
18	≥256	≥256	516	D → Y
19	≥256	≥256	526	H → L
20	≥256	≥256	516	D → N
23233 parental	16	16	—	—
21	≥256	64	516	D → G
22	≥256	64	516	D → G
23	≥256	64	516	D → G
24	≥256	64	516	D → N
25	≥256	64	516	D → G
26	≥256	64	516	D → G
27	≥256	64	516	D → G
28	≥256	64	516	D → G

I, Phe-Arg-β-naphthylamide, efflux pump inhibitor.
[a]Mutations found in *rpoB* gene.
Rfx, rifaximin.

The D516Y change has been previously described in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* but not in *E. coli*, and D516N, D516G, and S512F changes have been previously described in *E. coli* rifampicin-resistant mutants.[15] Although H526 and S574 have been described as point mutations involved in the development of rifampicin resistance,[15] to our knowledge, the specific H526N and S574Y changes have not been reported in the literature. Finally, the previously undescribed T525R point mutation was detected but does not seem to play a relevant role in the development of Rfx resistance, because the MIC of the two strains carrying this change (mutants 7 and 8) reverts toward the parental MIC in the presence of PAβN (Table 1). Interestingly, R525 is present as a wild-type amino acid in *Thermus aquaticus*, not being involved in the development of resistance to rifamycin.[15] Similarly, strain 13 carrying the amino acid substitution S512F reverts toward parental MIC in the presence of PAβN, suggesting that, despite reported being involved in the development of rifampicin resistance, its role in the development of Rfx resistance is low or null. The selection of this kind of mutations in the *rpoB* gene may result in the development of stable Rfx-resistant microbial populations. This fact, together with the relatively high facility to select Rfx-resistant strains *in vitro*,[10] as well as the lack of effect of these alterations on bacterial fitness, suggests the need to perform surveillance of the use of Rfx to detect and limit the selection of stable Rfx-resistant diarrheagenic pathogens. However, it has been shown that the number of Rfx-resistant coliforms and Enterococci isolated was low at baseline (pretreatment) and did not significantly increase at day 3 or 5 posttreatment, indicating no significant development of resistance during this period.[6] This apparent nonconcordance might be explained by the high levels of Rfx that might be achieved in the intestinal lumen after oral treatment, with 4,000–8,000 μg/g of stool being 160–250 times higher than the MIC_{90} for the various enteropathogens.[12] Although the bioavailability of Rfx has not been established, such high concentrations in the intestine may prevent or strongly limit the development of resistance to Rfx. However, no current studies have been performed on the selection of Rfx-resistant microorganisms after excretion in feces (*e.g.*, sewerage systems). Although amino acid substitutions in the *rpoB* gene have been related to high levels of resistance to rifampicin,[15] it is of concern that the high levels of Rfx resistance exhibited by these mutants, in some cases, were not exclusively associated with the presence of target mutations, but rather needed concomitant overexpression of the PAβN-inhibitible efflux pumps. Similar results analyzing the mechanisms of resistance to other antimicrobial agents have been observed, in which the apparently high levels of resistance conferred by target alterations are, in fact, due to the association of target alterations with efflux pump systems.[11] On comparing mutations in the *rpoB* gene and the role of the PAβN-inhibitible efflux pumps with the previously obtained stability of the mutants, it was observed that three of the seven Rfx-resistant mutants lacking mutations in the *rpoB* gene presented a modest decrease in the MIC levels. This may suggest a certain degree of reversion toward the parental MIC after 20 consecutive cultures in the absence of Rfx,[10] whereas this phenomenon was absent in all isolates in which an amino acid substitution was detected. However, in *in vivo* situations, the reversion of PAβN-inhibitible efflux pump overexpression may be limited by the effect of bile salts.

Rifampicin plays an important role in clinical practice, as a part of standard therapy of tuberculosis, prophylaxis of meningitis, and against staphylococcal infections.[16] Previous results have shown the presence of cross-resistance between these two agents, Rfx and rifampicin, and accordingly, the present results show similarity between resistance mechanisms in these two agents. Thus, extensive use of Rfx might have a possible negative effect on the activity of rifampicin. Future studies are of special concern in that they refer to the possible use of Rfx as an alternative to antibacterial agents currently in use in developing countries, because of the relevance of tuberculosis in these areas. However, referring to its possible use in treating diarrhea in children, no data are currently available to support the efficacy and safety in persons under 18 years of age.[6]

In summary, different mechanisms were found to be involved in the development of Rfx resistance in *E. coli* strains. The present results show the easy selection of *rpoB* mutations as well as the concomitant overexpression of PAβN-inhibitible efflux pumps. Further studies with clinical Rfx-resistant isolates are needed to determine the transfer of these results to clinical settings.

Acknowledgments

The strains used as control were kindly provided by L. Martínez, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. This study was supported by the grant CP05/0130 from the FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Spain) to J.R. and by Laboratorios Bama-Geve.

Disclosure Statement

The authors do not have any commercial associations that might create a conflict of interest in connection with this manuscript. This study was partially funded by Laboratories Bama-Geve. The sponsor of the study had no role in study design, data collection, data interpretation, or the writing of the report. J.R. had full access to all the data in the study and was responsible for the decision to submit for publication. We declare that we have no conflict of interest.

References

1. **Baysarowich, J., K. Koteva, D. Hughes, L. Ejim, E. Griffiths, K. Zhang, M. Junop, and G.D. Wright.** 2008. Rifamycin antibiotic resistance by ADP-ribosylation structure and diversity of Arr. Proc. Natl. Acad. Sci. **105:**4886–4891.
2. **Bryce, J., C. Boschi-Pinto, K. Shibuya, and R.E. Black.** 2005. WHO estimates of the causes of death in children. Lancet **365:**1147–1152.
3. **Gascón, J.** 2006. Epidemiology, etiology and pathophysiology of traveler's diarrhea. Digestion **73 Suppl 1:**102–108.
4. **Hart, C.A., and S. Kariuki.** 1998. Antimicrobial resistance in developing countries. BMJ **317:**647–650.
5. **Huang, D., and H.L. Dupont.** 2005. Rifaximin-a novel antimicrobial for enteric infections. J. Infect. **50:**97–106.
6. **Layer, P., and V. Andresen.** 2010. Review article: rifaximin, a minimally absorbed oral antibacterial, for the treatment of traveller's diarrhoea. Aliment. Pharmacol. Ther. **31:**1155–1164.
7. **Mensa, L., F. Marco, J. Vila, and J. Ruiz.** 2008. Quinolone resistance among *Shigella* spp. isolated from travellers returning from India. Clin. Microbiol. Infect. **14:**279–281.
8. **Ruiz, J., F. Marco, I. Oliveira, J. Vila, and J. Gascón.** 2007. Trends in antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp. causing traveller's diarrhea. APMIS **115:**218–224.
9. **Ruiz, J., L. Mensa, C. O'Callaghan, M.J. Pons, A. Gonzalez, J. Vila, and J. Gascón.** 2007. *In vitro* antimicrobial activity of rifaximin against enteropathogens causing traveller's diarrhea. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **59:**473–475.
10. **Ruiz, J., L. Mensa, M.J. Pons, J. Vila, and J. Gascón.** 2008. Development of *Escherichia coli* rifaximin-resistant mutants: frequency of selection and stability. J. Antimicrob. Chemother. **61:**1016–1019.
11. **Sáenz, Y., J. Ruiz, M. Zarazaga, M. Teixidó, C. Torres, and J. Vila.** 2002. Effect of efflux pump inhibitor Phe-Arg-β-naphthylamide on the MIC values of the quinolones, tetracycline and chloramphenicol, in *Escherichia coli* isolates of different origin. J. Antimicrob. Chemother. **53:**544–545.
12. **Scarpignato, C., and I. Pelosini.** 2005. Rifaximin, a poorly absorbed antibiotic: pharmacology and clinical potential. Chemotherapy **51:**36–38.
13. **Severinov, K., M. Soushko, A. Goldfarbs, and V. Nikiforov.** 1993. New rifampicin-resistant and streptolydigin–resistant mutants in the β subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. J. Biol. Chem. **268:**14820–14825.
14. **Tavío, M., J. Vila, M. Perilli, L. Casañas, L. Maciá, G. Amicosante, and M.T. Jiménez de Anta.** 2004. Enhanced active efflux, repression of porin synthesis and development of Mar phenotype by diazepam in two enterobacteria strains. J. Med. Microb. **53:**1119–1122.
15. **Tupin, A., M. Gualtieri, F. Roquet-Banères, Z. Morichaud, K. Brodolin, and J.P. Leonetti.** 2010. Resistance to rifampicin: at the crossroads between ecological, genomic and medical concerns. Int. J. Antimicrob. Agents **35:**519–523.
16. **Xu, M., Y. Ning, B.P. Goldstein, and D.J. Jin.** 2005. Cross-resistance of *Escherichia coli* RNA polymerases confering rifampin resistance to different antibiotics. J. Bacteriol. **187:**2783–2792.

Address correspondence to:
Joaquim Ruiz, Ph.D., M.Sc.
Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona (CRESIB)
IDIBAPS—Hospital Clinic-Universitat de Barcelona
Ed. CEK pl 1
C/Rosselló 153
08036 Barcelona
Spain

E-mail: joruiz@clinic.ub.es

ARTICLE 8

Relevant role of efflux pumps in high levels of rifaximin resistance in *Escherichia coli* clinical isolates.

Important paper de les bombes d'expulsió en soques d'*Escherichia coli* amb alts nivells de resistència a rifaximina en aïllats clínics.

Gomes C, Ruiz L, **Pons MJ**, Ochoa TJ, Ruiz J.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2013 Sep;107(9):545-549.

RESUM

Com ja es va demostrar en estudis previs, els enteropatògens causants de diarrea infantil han mostrat un elevat nivell de resistència contra els fàrmacs antibacterians d'ús comú a Perú i urgeix la necessitat d'explorar tractaments alternatius.

En aquest treball es pretenia estudiar quina era l'activitat *in vitro* de la RFX en soques d'*E. coli* que presentaven caràcter diarreogènic i soques comensal que formaven part de la microbiota, ambdós tipus aïllades en nens menors de 2 anys d'edat de la zona periurbana de Lima .

La CMI a 210 soques, s'utilitzà per esbrinar l'activitat de la rifampicina i RFX, en presència i absència de el PAβN, l'inhibidor de les bombes d'expulsió, i s'estudiaren els mecanismes de resistència implicats.

Els resultats trobats en aquest estudi foren:

- Existia una bona correlació entre la CMI de RFX i rifampicina, amb tendència a que la CMI de rifampicina fos un xic més elevada.
- Els nivells de CMI variaven entre 8 i 256 mg/L i els mecanismes predominants de la resistència a RFX eran les bombes d'expulsió inhibides per PAβN en 95,2% de les soques estudiades.
- La presència de mutacions en la diana, *rpoB*, i de gens transferibles tipus *arr* foren molt poc importants, amb l'existència de només 2 soques amb mutacions i 3 soques (1,4%) amb presència de mecanismes transferibles (gen *arr3*).

Els resultats foren sorprenents ja que els valors de CMI trobats per la RFX eren més alts que els observats en altres estudis, i les bombes d'expulsió inhibides per PAβN eren la causa de la resistència a RFX en la majoria dels casos. Els resultats feien suggerir de la presència d'algun tipus d'element que pot exercir una pressió selectiva en el medi ambient.

En conseqüència l'estudi conclou que la RFX s'ha d'utilitzar amb precaució en el tractament de la diarrea a Perú.

Trans R Soc Trop Med Hyg 2013; **107**: 545–549
doi:10.1093/trstmh/trt059 Advance Access publication 9 July 2013

ORIGINAL ARTICLE

Relevant role of efflux pumps in high levels of rifaximin resistance in *Escherichia coli* clinical isolates

C. Gomes[a], L. Ruiz[a], M.J. Pons[a], T.J. Ochoa[b,c] and J. Ruiz[a,*]

[a]*Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clinic – Universitat de Barcelona, Spain;* [b]*Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Peru;* [c]*Center for Infectious Diseases, University of Texas School of Public Health, Houston, Texas, USA*

*Corresponding author: Present address: CEK, CRESIB Hospital Clinic/ IDIBAPS, C/Rosselló 149-153. 08036-Barcelona, Spain; Tel: +34 227 5400 ext 4547; Fax: +34 932 279 853; E-mail: joruiz@clinic.ub.es

Received 14 February 2013; revised 6 June 2013; accepted 7 June 2013

Background: Enteropathogens have shown a high level of resistance against commonly used antibacterial drugs in Peru and it is necessary to explore alternative treatments. The aim of this study was to analyse the *in vitro* activity of rifaximin against diarrhoeagenic and commensal *Escherichia coli* in children less than 2 years of age.

Methods: The minimal inhibitory concentration (MIC) to rifampicin and rifaximin was determined for 210 strains in the presence and absence of phenyl-arginine-β-naphthylamide (PAβN) and the mechanisms of resistance were investigated.

Results: The MIC levels ranged between 8 and >256 mg/litre and the predominant mechanism of resistance to rifaximin was the efflux pumps inhibited by PAβN in 95.2% of the isolates.

Conclusions: The present MIC values are higher than those observed in other studies. Efflux pumps inhibited by PAβN were the cause of the rifaximin resistance in the majority of cases and suggest the presence of an environmental selective pressure. Consequently, rifaximin should be used with caution in the treatment of diarrhoea in Peru.

Keywords: Rifaximin, Escherichia coli, Efflux pumps, Diarrhoea, Antibiotic resistance

Introduction

Diarrhoea is one of the leading causes of mortality and morbidity worldwide, especially affecting children from low and middle-income countries.[1] In Peru, diarrhoea has been recognised as the third cause of death in children under 5 years of age.[2] Different microorganisms, including bacteria, parasites or virus, have been involved as an aetiological cause of this illness. Worldwide, *Escherichia coli* is one of the major causes of diarrhoea. Currently, six different diarrhoeagenic *E. coli* (DEC) pathotypes have been described: enteroaggregative (EAEC), enteropathogenic (EPEC), enterotoxigenic (ETEC), diffusely adherent (DAEC), enteroinvasive (EIEC) and enterohaemorrhagic (EHEC). The importance of the different pathotypes differs: EAEC, EPEC and ETEC are most frequently isolated as a cause of children's or travellers' diarrhoea.[3] In Peru, the same three pathotypes, EAEC and EPEC followed by ETEC, rank among the main aetiological causes of diarrhoea.[4] DEC-associated diarrhoea is usually a self-limited illness that only requires oral rehydration treatment, but different factors, such as severity, duration or specific host situations, may result in the use of antibacterial drugs. Unfortunately, the continuous increase in resistance to most of the usual antibacterial drugs has resulted in a lack or diminished activity of these drugs and the need to search for alternatives.[5] Moreover, this increasing level of antibiotic resistance also affects commensal microorganisms, which act as a reservoir of resistance genes.[6] To solve this problem, different alternative antibiotics have been used in different studies focused on the determination of the potential use of furazolidone, azithromycin or rifaximin (Rfx), among others.[5,7,8]

Rfx is a semi-synthetic non-absorbable derivative of rifamycin. Rfx was introduced in the treatment of different pathologies, including the treatment of travellers' diarrhoea,[9] after different studies showed that this antibiotic possessed good *in vitro* activity against the main diarrhoeagenic bacteria, except for *Campylobacter* spp. and *Yersinia* spp.,[7] as well as good tolerance and in vivo effectiveness.[10] Studies analysing the susceptibility of DEC have usually shown minimal inhibitory concentration MIC_{50} levels of 8 mg/litre and MIC_{90} levels of 16 mg/litre, with the highest Rfx MICs being 32 mg/litre.[7,11,12] However, highly Rfx-resistant mutants of *E. coli* (MIC >256 mg/litre) have been relatively easily developed *in vitro*,[13] showing the possibility of development of Rfx-resistance in clinical isolates by increased activity of efflux pumps and by the development of *rpoB* mutations.[14] Mutations clustered in three highly conserved regions in the mid-portion of

© *The Author 2013. Published by Oxford University Press on behalf of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.*

the *rpoB* gene have been found to have rifamycin derivates resistance. Cluster I includes codons 505–537, cluster II codons 563–575 and cluster III codons 684–690.[14,15] Although no efflux pump inhibitor (EPI) has been introduced in clinical practice, different EPIs have been studied for future design of combinative treatments.[16] In fact, only one EPI with an actual clinical use, artesunate (an antimalaria drug), has been explored.[17] Regarding rifamycin derivatives, the synergistic effect of different EPIs, such as 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-β-naphthylamide (PAβN), has been explored.[14,18,19] PAβN is one of the most widely used EPI *in vitro*, including studies in which the MIC levels of different antimicrobial agents are performed in the presence and absence of this EPI.[20,21] Recently, Pons *et al.*,[14] working with *in vitro E. coli* Rfx-resistant mutants, show that the combination of Rfx with PAβN may result in MIC decreases from >256 mg/litre to 16 mg/litre. Similar data have been obtained in studies with clinical isolates.[19] Furthermore, the involvement of several genes, such as different *arr* genes, usually encoded in genetic mobile elements, is emerging in the development of resistance to rifamycin derivatives.[22]

The aim of the present study was to establish the levels of resistance of Rfx and rifampicin (Rfp) and determine the different mechanisms of resistance in commensal and diarrhoeagenic isolates of *E. coli* in a periurban area of Lima, Peru.

Material and methods

Bacterial strains

A total of 210 *E. coli* samples were randomly selected from a previous collection collected in the Chorrillos district, a periurban area of Lima, as part of a prospective passive diarrhoea surveillance cohort study of 1034 infants followed up from 2–12 months of age, designed to evaluate aetiological causes of diarrhoea.[23] The study was approved by the Ethical Review Board of the Instituto de Investigación Nutricional and Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru. From the 210 samples in the study, 136 strains were DEC (47 EAEC, 47 EPEC, 24 DAEC and 18 ETEC) and 74 commensal. Only one sample for a diarrhoea episode was considered.

Antimicrobial susceptibility testing

The MICs to Rfx and Rfp were established by agar dilution method as described in the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines.[24] Briefly, an inoculum of 10^4 cfu of each microorganism was inoculated onto Mueller Hinton agar plates containing serial dilutions (from 0.007 mg/litre to 256 mg/litre) of the selected antimicrobial agent using a Steers replicator.

Antimicrobial susceptibility testing in the presence of PAβN

The role of PAβN-inhibitable efflux pumps in resistance was assessed establishing the MICs to Rfx and Rfp following the above mentioned CLSI guidelines but adding 20 mg/litre of PAβN.[21] Differences of only one dilution in the MIC levels were not considered. The effect of this concentration of PAβN on the viability of microorganisms was evaluated by growing the microorganisms in Mueller Hinton plates without antibiotic and containing only 20 mg/litre of PAβN.

Detection of the *rpoB* gene mutations

In the isolates presenting a MIC with PAβN ≥16 mg/litre, the presence of mutations in the *rpoB* gene was established by PCR. A fragment of 1057 bp (containing clusters I, II and III) was amplified using the following primers and conditions: 5′AAGCTCATCGATATCCGTAACG3′ and 5′GCACGTCGCCACGTTCAACC3′ for 30 cycles at 94°C, 30 s, 60°C, 30 s, 72°C, 30 s and a final elongation at 72°C for 10 min.[14] The PCR product was recovered using a commercial kit (Wizard SV gel and PCR Clean-up system; Promega, Madison, WI, USA) and sequenced (Macrogen, Seoul, Korea). The sequences, containing all three above mentioned clusters, were aligned and compared with a sequence consensus of GenBank accession no. CP000800.1 using the Bioedit program (Bioedit 7.1.3.0, Manchester, UK).

Transferable mechanisms of Rfx/Rfp resistance

In the same group of isolates in which the presence of mutations in the *rpoB* gene was determined, we also sought the presence of the *arr2*, *arr3*, *arr4*, *arr5*, *arr6* and *arr7* genes. These genes were amplified by PCR as previously described.[25]

Conjugation assays

In the isolates with an *arr* gene, a conjugation assay was performed. The conjugation was carried out in Luria-Bertani broth with azide-resistant *E. coli* J53 as a recipient strain. Transconjugants were selected in plates containing 150 μg/ml of sodium azide and 16 or 128 mg/litre of Rfx.

Results

A good correlation was observed between the MICs of Rfx and Rfp with levels ranging between 8 and >256 mg/litre. Generally, the Rfp MIC levels were slightly higher than those of Rfx. Overall, the Rfx MICs were high, with 53 (25.2%) isolates having a MIC level for Rfx of at least 64 mg/litre (1 out of 24 DAEC: 4.2%; 2 out of 18 ETEC: 11.1%; 6 out of 47 EPEC: 12.8%; 8 out of 47 EAEC: 17%; 36 out of 74 commensal isolates: 48.6%; Table 1). The Rfx/Rfp MIC_{50} was 32/64 mg/litre and the MIC_{90} was 64/128 mg/litre. When PAβN was added, the MIC_{50} was 4/2 mg/litre and the MIC_{90} was 8/8 mg/litre (Table 1). On analysis by pathotypes, no relevant differences were found. However, as a general trend, the MIC levels both in the absence or presence of PAβN were higher for commensal isolates compared to the DECs (Table 1).

We observed that the predominant mechanism conferring resistance to Rfx was the efflux-pumps inhibitible by PAβN after the MIC in the presence of PAβN decreased at least twofold in 200 (95.2%) of the isolates. In the isolates presenting a MIC with PAβN ≥16 mg/litre, the presence of mutations in the *rpoB* gene as well as the presence of transferable *arr* genes was studied. Regarding mutations in the *rpoB* gene, two isolates presenting Rfx MIC values of 64 and 128 mg/litre, which decreased to 16 mg/litre in the presence of PAβN, showed the amino acid codon substitutions E626-K (isolate 0165) and V723-T (isolate 3491), respectively (Table 2). With transferable mechanisms of resistance, only three (1.4%) commensal isolates (3221, 7172 and

Table 1. Minimal inhibitory concentration $(MIC)_{50}$ and MIC_{90} to rifampicin and rifaximin of the *E. coli* isolates in the presence and absence of phenyl-arginine-β-naphthylamide(PaβN)

		n[b]		MIC (mg/l)[a]										MIC_{50} (mg/l)	MIC_{90} (mg/l)
				1	2	4	8	16	32	64	128	256	> 256		
Rfp	DEC[c]	136	—	0	0	0	0	14	27.9	52.9	3.7	0	1.5	64	64
			With PAβN	17.7	48.5	24.3	2.9	5.9	0	0	0	0	0.7	2	4
	EAEC	47	—	0	0	0	0	2.1	31.9	53.2	8.5	0	4.3	64	128
			With PAβN	27.7	51	14.9	0	4.3	0	0	0	0	2.1	2	4
	EPEC	47	—	0	0	0	0	27.7	23.4	48.9	0	0	0	32	64
			With PAβN	14.9	40.4	34	6.4	4.3	0	0	0	0	0	2	4
	DAEC	24	—	0	0	0	0	20.8	37.5	41.7	0	0	0	32	64
			With PAβN	0	50	37.5	4.2	8.3	0	0	0	0	0	2	8
	ETEC	18	—	0	0	0	0	0	16.7	77.8	5.5	0	0	64	64
			With PAβN	22.2	61.1	5.6	0	11.1	0	0	0	0	0	2	4
	Commensal	74	—	0	0	0	0	1.4	35.1	37.8	16.2	0	9.5	64	128
			With PAβN	6.8	20.3	58.1	1.3	8.1	0	0	0	0	5.4	4	16
	All isolates	210	—	0	0	0	0	9.5	30.5	47.6	8.1	0	4.3	64	128
			With PAβN	13.8	38.5	36.2	2.4	6.7	0	0	0	0	2.4	2	8
Rfx	DEC[c]	136	—	0	0	0	5.9	18.4	63.3	10.3	0.7	0.7	0.7	32	64
			With PAβN	0.7	20.6	69.1	5.9	1.5	1.5	0	0.7	0	0	4	4
	EAEC	47	—	0	0	0	4.3	0	78.7	12.8	2.1	0	2.1	32	64
			With PAβN	0	10.6	78.7	4.3	4.3	0	0	2.1	0	0	4	4
	EPEC	47	—	0	0	0	8.5	31.9	46.8	12.8	0	0	0	32	64
			With PAβN	2.1	36.2	51.1	8.5	2.1	0	0	0	0	0	4	4
	DAEC	24	—	0	0	0	4.2	29.1	62.5	4.2	0	0	0	32	32
			With PAβN	0	4.2	83.3	8.3	0	4.2	0	0	0	0	4	8
	ETEC	18	—	0	0	0	5.6	16.6	66.6	5.6	0	5.6	0	32	32
			With PAβN	0	27.8	72.2	0	0	0	0	0	0	0	4	4
	Commensal	74	—	0	0	0	0	6.8	44.6	37.8	5.4	0	5.4	32	128
			With PAβN	0	10.8	50	27	4	2.7	0	2.7	1.4	1.4	4	16
	All isolates	210	—	0	0	0	3.8	14.3	56.6	20	2.4	0.5	2.4	32	64
			With PAβN	0.5	17.1	62.4	13.3	2.4	1.9	0	1.4	0.5	0.5	4	8

DEC: diarrhoeagenic *E. coli*; DAEC: diffusely adherent *E. coli;* EAEC: enteroaggregative *E. coli*; EPEC: enteropathogenic *E. coli*; ETEC: enterotoxigenic *E. coli*.
[a]Percentage of isolates presenting each MIC level with PAβN and without PAβN (–).
[b]Number of isolates.
[c]Sum of all diarrhoeagenic pathotypes (EAEC, EPEC, DAEC and ETEC).

0165) showed the presence of the *arr3* gene. Thus, we observed that in the four (1.9%) isolates mentioned previously, resistance could be explained by the substitutions found in the *rpoB* gene, by the presence of the *arr3* gene or by the combination of these two mechanisms together (isolate 0165). Further studies are necessary to full understand the mechanisms responsible for the Rfx resistance in isolates with a MIC in the presence of PAβN ≥16 mg/L in which no mechanisms (*rpoB* or *arr* genes) were found (Table 2). No transconjugants were obtained from isolates presenting the *arr3* gene.

Discussion

Because Rfx is a non-absorbable drug and reaches high concentrations in the intestinal lumen of >4000–8000 μg/g of faeces,[26] this antibacterial drug is used in the treatment of travellers' diarrhoea and has also been tested against enteric pathogens causing infantile diarrhoea in some developing areas.[9,11] Studies usually show good *in vitro* activity against DEC and other enteric pathogens with MIC_{50} and MIC_{90} levels, which are usually around 8 and 16 mg/litre, respectively.[7,11,12] However, our results are unusual and show the lowest MIC to Rfx was 8 mg/litre, with a MIC_{50} of 32 mg/litre and a MIC_{90} of 64 mg/litre. Although high concentrations of Rfx in the intestinal lumen might be useful for the treatment of this kind of bacteria, these results are a concern and, thus, the possible use of Rfx in the study area should be closely monitored for early detection of possible therapeutic failures.

The study of the mechanisms of resistance has shown the relevant role of PAβN-inhibitible efflux pumps in the high levels of resistance and the low presence of *rpoB* mutations or *arr* genes.

Table 2. Rifaximin resistance mechanisms in isolates with stable or high rifaximin minimal inhibitory concentration (MIC) levels

		Rifaximin			
Isolate	Pathotype	MIC[a]	MIC[a] PAβN	*rpoB*	*arr3*
0165	Commensal	64	16	E626-K	+
3491	EAEC	128	16	V723-T	–
7172	Commensal	>256	256	—	+
3121	Commensal	>256	>256	—	+
3178	EAEC	32	16	—	–
7123	Commensal	32	32	—	–
3048	Commensal	32	32	—	–
7062	Commensal	64	16	—	–
3181	EPEC	64	32	—	–
7202	DAEC	64	32	—	–
0101	Commensal	128	16	—	–
3421	EAEC	>256	128	—	–
3382	Commensal	>256	128	—	–
3186	Commensal	>256	128	—	–

—: without substitutions; DAEC: diffusely adherent *E. coli*; EAEC: enteroaggregative *E. coli*; EPEC: enteropathogenic *E. coli*.
[a]All MIC values are in mg/litre.

Although these efflux pumps have been involved in the resistance to several antibiotics, including Rfx, by decreasing the MIC levels in the presence of the efflux pump inhibitor,[14,19,21] to our knowledge this is the first time that these efflux pumps have been so extensively described as the cause of a specific antibiotic resistance in a large series of clinical isolates of *E. coli*. Moreover, this phenomenon has not been observed in other studies addressing Rfx resistance and it may, therefore, be concluded that these high levels of effect on the MIC of Rfx are unusual and may be the result of the constitutive overexpression of efflux pumps. Although the biological functions of efflux pumps remain partly unexplained, their role in the extrusion of different toxics and other substances has been demonstrated.[27] Therefore, the constitutive overexpression of an efflux pump in microorganisms with a common origin may reflect a specific environmental situation.

With regard to the *rpoB* gene, none of the substitutions found have been previously described. The substitutions were located out of the three clusters of resistance and although the E626-K represents a change in the amino acid charge, and perhaps has an effect on the structure of the RpoB, it is possible that none of these substitutions were involved in the resistance found. Interestingly, the isolate 0165, which has the aforementioned E626-K amino acid substitution, also has the *arr3* gene, but its MIC levels are lower than those of the other two isolates that have only the *arr3* gene and to those described in the literature when this gene is present,[22] suggesting a possible missfunction of *arr3* or a higher susceptibility to Rfx. Further *in vitro* studies are necessary to establish the role of these substitutions. Moreover, the gene *arr3* was only observed in three (1.4%) of the isolates, revealing the low amount of potential transferable Rfx resistance mechanisms in the study area. Additionally, its dissemination among microorganisms in the studied area seems to be non-efficient since no transconjugants were obtained.

A limitation of this study is the need to consider the presence of isolates exhibiting high levels of Rfx resistance in which no molecular mechanism of resistance was found, showing the presence of other mechanisms involved in the development of Rfx resistance. In addition, further studies in different areas of Lima and Peru are needed to determine the real extension of this type of Rfx resistant *E. coli*.

To conclude, this study reveals high levels of Rfx resistance in clinical strains of *E. coli* isolated from faeces of Peruvian children. Interestingly, efflux pumps underlie these high levels of resistance suggesting some environment pollutant.

Authors' contributions: CG and JR designed the study. CG, LR, MJP and TJO conducted the experiments and gathered data and isolates. CG, LR and MJP analysed the data. CG and JR wrote the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript. CG and JR are the guarantors of the paper.

Funding: This work was supported by the Programa de Cooperación Interuniversitaria e Investigación Científica con Iberoamérica from Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID), Spain (D/019499/08, D/024648/09; D/030509/10; A1/035720/11). JR has a fellowship from the program I3 of the ISCIII (CES11/012).

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

1 The United Nations Children's Fund/World Health Organization. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done. Geneva, Switzerland: WHO; 2009.

2 Huicho L, Trelles M, Gonzales F. National and sub-national under-five mortality profiles in Peru: a basis for informed policy decisions. BMC Public Health 2006;6:173–82.

3 Ochoa TJ. Diarrea producida por *Escherichia coli*. Rev Peru Enferm Infec Trop 2006;5:17–21.

4 Ochoa TJ, Mercado E, Durand D et al. Frequency and pathotypes of diarrheagenic Escherichia coli in Peruvian children with and without diarrhea [in Spanish]. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2011;28:13–20.

5 Adachi JA, Ericsson CD, Jiang ZD et al. Azithromycin found to be comparable to levofloxacin for the treatment of US travellers with acute diarrhea acquired in Mexico. Clin Infect Dis 2003;37:1165–71.

6 Pons MJ, Mosquito S, Ochoa TJ et al. Levels of quinolones resistance and other antimicrobial in non-pathogenic *Escherichia coli* strains in children from the periurban area of Lima, Peru. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2012;29:82–6.

7 Sierra JM, Ruiz J, Navia MM et al. *In vitro* activity of rifaximin against enteropathogens producing traveler's diarrhea. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:643–4.

8 Anonymus. Guia para el abordaje de las enfermedades infecciosas más comunes de la infancia y la desnutrición. 2009; Managua, Nicaragua.

9 DuPont HL, Ericsson CD, Farthing MJ et al. Expert review of the evidence base for self-therapy of travelers' diarrhea. J Travel Med 2009;16:161–71

10 DuPont HL. Biologic properties and clinical uses of rifaximin. Expert Opin Pharmacother 2011;12:293–302.

11 Sierra JM, Navia MM, Vargas M et al. *In vitro* activity of rifaximin against bacterial enteropathogens causing diarrhoea in children under 5 years of age in Ifakara, Tanzania. J Antimicrob Chemother 2001;47: 904–5.

12 Ruiz J, Mensa L, O'Callaghan C et al. *In vitro* antimicrobial activity of rifaximin against enteropathogens causing traveler's diarrhea. Diagn Microbiol Infect Dis 2007;59:473–5.

13 Ruiz J, Mensa L, Pons MJ et al. Development of *Escherichia coli* rifaximin-resistant mutants: frequency of selection and stability. J Antimicrob Chemother 2008;61:1016–9.

14 Pons MJ, Mensa L, Gascón J et al. Fitness and molecular mechanisms of resistance to rifaximin in *in vitro* selected *Escherichia coli* mutants. Microb Drug Resist 2012;18:376–9.

15 Severinov K, Soushko M, Goldfarbs A et al. New rifampicin-resistant and streptolydigin–resistant mutants in the b subunit of Escherichia coli RNA polymerase. J Biol Chem 1993;268:14820–5.

16 Lomovskaya O, Bostian KA. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic – A vision for applied use. Biochem Pharmacol 2006;71:910–8.

17 Li B, Yao Q, Pan X et al. Artesunate enhances the antibacterial effect of β-lactam antibiotics against *Escherichia coli* by increasing antibiotic accumulation via inhibition of the multidrug efflux pump system AcrAB-TolC. J Antimicrob Chemother 2011;66:769–77.

18 Pannek S, Higgins PG, Steinke P et al. Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-β-naphthylamide. J Antimicrob Chemother 2006;57:970–4.

19 Kothary V, Scherl EJ, Bosworth B et al. Rifaximin resistance in *Escherichia coli* associated with inflammatory bowel disease correlates with prior rifaximin use, mutations in *rpoB*, and activity of Phe-Arg-β-Naphthylamide-Inhibitable efflux pumps. Antimicrob Agents Chemother 2013;57:811–7.

20 Gomes C, Pons MJ, Magallon-Tejada A et al. *In vitro* development and analysis of *Escherichia coli* and *Shigella boydii* azithromycin-resistant mutants. Microb Drug Resist 2013;19:88–93.

21 Sáenz Y, Ruiz J, Zarazaga M et al. Effect of the efflux pump inhibitor Phe-Arg-β-naphthylamide on the MIC values of the quinolones, tetracycline and chloramphenicol, in *Escherichia coli* isolates of different origin. J Antimicrob Chemother 2004;53:544–5.

22 Baysarowich J, Koteva K, Hughes DW. Rifamycin antibiotic resistance by ADP-ribosylation: structure and diversity of Arr. Proc Natl Acad Sci 2008;105:4886–91.

23 Ochoa TJ, Ecker L, Barletta F et al. Age-related susceptibility to infection with diarrheagenic *Escherichia coli* in infants from peri-urban areas of Lima, Peru. Clin Infect Dis 2009;49:1694–702.

24 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first informational supplement M100-S21. Wayne, Pensylvania: CLSI; 2011.

25 Mushtaq S, Hopkins KL, Richardson JF et al. *In vitro* activity of rifaximin against *Escherichia coli* with prevalent ESBLs and carbapenemases. Clin Microbiol Infect 18:330.

26 Jiang ZD, Ke S, Palazzini E et al. *In vitro* activity and fecal concentration of rifaximin after oral administration. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:2205–6.

27 Thanassi DG, Cheng LW, Nikaido H. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. J Bacteriol 1997;179:2512–8.

DISCUSSIÓ

La vigilància de les resistències es considera una de les prioritats per reduir el problema de la resistència a nivell mundial. A nivell global, es creu que el control de la resistència dependrà d'un esforç integrat i multidimensional, el qual perquè es pugui dur a terme, cal un compromís polític i disposar de recursos econòmics suficients. I és clau la col·laboració de diferents sectors amb organitzacions, institucions acadèmiques, la societat civil i les indústries. [144]

A nivell més local, cal un sistema de vigilància, per conèixer els patrons de sensibilitats a antimicrobians de les diferents àrees geogràfiques, per ajudar a escollir les teràpies empíriques adequades, i això s'aconsegueix a través de vigilàncies tan a nivell fenotípic com genotípic.

Els tres primers articles d'aquesta tesis aporten coneixement en aquest àmbit, en la importància de la vigilància de l'epidemiologia de resistències en una franja d'edat concreta i en un àrea específica de Lima, per aportar coneixement en aquesta edat, per poder avaluar l'impacte de l'ús d'antimicrobians en aquesta població i sobretot per tenir un armament d'antimicrobians més adequat a les necessitats, i fer-ne un bon ús. A aquestes alçades és important recordar que la diarrea és la segona causa de mort en nens menors de 5 anys al món. I que, entre d'altres, en cas de diarrea persistent o disenteria es recomana prendre antibiòtics. [31] Tanmateix als països de mitja-baixa renda, hi ha d'altres factors com la malnutrició, o la presencia d'altres patologies, pacients amb sistema immunes compromesos, que també fan recomanable emprar antibiòtics per tractar la diarrea. [144]

Concretament el primer article ens ajuda a tenir una visió de les dinàmiques de les resistències en aquesta comunitat i franja d'edat, realitzant un abordatge dels mecanismes genètics de resistència en soques patogèniques i comensals d'una mateixa cohort d'infants. Ens descriu la gran variabilitat de gens de resistència,

destacant el nivell de resistència en soques comensals, posant de manifest l'ús dels antimicrobians en aquests subjectes.

Amb la premissa que les soques que formen part de la microbiota normal poden actuar com a reservori de gens de resistència, estudiar aquestes soques ens aporta informació de l'ús de la pressió antibiòtica a la comunitat, que es deu, no tan sols al consum directe com a resultats dels tractaments recomanats pels especialistes mèdics, sinó també afegir paper de l'automedicació, afavorida per la venda lliure o l'ús d'antibiòtics en els diferents ambients com en veterinària o agricultura. L'estudi de la microbiota, ja no sols en humans, sinó en general, es preveu un punt clau per estudiar les dinàmiques de resistències dels gens relacionats, en la comunitat. [131]

El més habitual es trobar nivells de resistència més elevats en soques patogèniques, que són les que estan sota la pressió directa dels antimicrobians utilitzats com a teràpia. Això es així pel que fa al cotrimoxazole, un antibiòtic emprat a bastament pel tractament de diferents malalties a població pediàtrica, com s'observa a les mostres analitzades a l'estudi 1, però curiosament trobem que en els nostres estudis la resistència a quinolones, és més elevada en soques comensals que en les soques patogèniques, a pesar que aquesta família d'antimicrobians té un ús molt limitat en aquesta franja d'edat. Els resultats dels estudis mostren que, en termes generals, no hi ha diferències entre els 3 grups de soques en nivell de sensibilitat; en el grup de les comensals, les diarreogèniques en grup control i les diarreogèniques aïllades de casos, només en excepció de tres antimicrobians, àc. nalidíxic, ampicil·lina i cotrimoxazole. Concretament els valors de resistència foren més elevats en soques comensals per a àc. nalidixic, i referent al cotrimoxazole presentava nivells més elevat en soques diarreogèniques. En el cas del cotrimoxazole, la seva elevada taxa de resistència, així com la gran variabilitat de mecanismes de resistència implicats, es deu a la gran disseminació dels gens que en causen la resistència, segurament per l'elevat ús que es porta a terme amb aquest antimicrobià, sobretot en microorganismes gramnegatius, essent altament usat com a tractament en població pediàtrica, especialment en nens menors de 2 anys. [146]

Els resultats trobats estan en concordança amb estudis realitzats en altres regions properes de l'Amèrica llatina, com Bolívia, on estudis amb soques provinents de diarrea i control realitzats anteriorment, coincideixen amb l'elevada resistència als

antibiòtics “antics”, sobretot en ampicil·lina, tetraciclina i cotrimoxazole. On es van trobar valors més alts de resistència en soques diarreogèniques que en comensals. [157] En estudis en el mateix país, Bolívia, es van trobar valors de 98%, 95%, 94%i 78% a ampicil·lina, tetraciclina, cotrimoxazole i cloramfenicol respectivament, i es destaca l'augment de les taxes de resistència a antibiòtics d'ús més recent com les quinolones o les cefalosporines. [111] El mateix estudi de les mostres fecals en nens sans, sense diarrea, mostren nivells de 76% de resistència a ac. nalidíxic, 44% a ciprofloxacina o 12,4% en cefalosporines d'ampli espectre d'acció i que aquest augment és d'especial importància en els últims 10 anys. [111]

Els elevats valors de resistència en les mostres de Lima, van en la mateixa línia del que succeeix arreu del món en les soques d'*E. coli* aïllades en nens amb diarrea. Ja sigui la mateixa regió de Sud Amèrica, [157, 158] com al continent Africà [159] o al continent asiàtic [160] amb l'agreujant que a aquest últim, se li sumen valors de resistència a quinolones que a algunes àrees arriben al 100%). [161]

Referent a la importància de realitzar una vigilància a nivell genètic, conèixer quins mecanismes estan implicats en aquesta, es un valor afegit per entendre la creació, selecció i possible disseminació d'aquests gens en la comunitat, per intentar crear estratègies més adequades de control, i teràpies més eficaces.
En aquest primer article, es recalca que la majoria de mecanismes trobats, gens *cat*, *sul*, *floR*, bla_{TEM}, sovint s'associen a elements mòbils. Així s'observa una elevada disseminació d'aquests gens en aquesta franja d'edat i per aquesta població, afavorint-se la seva selecció i manteniment sobretot per l'ús concret d'antimicrobians. [146] És interessant dir que no es troba un nombre important de mostres que presentessin integrases, essent així sembla que la presència i disseminació d'integrons a aquestes soques no es elevada.

Aquest article, posà de manifest la necessitat de cercar d'altres mecanismes de resistència, a banda dels típicament descrits en *E. coli*, ja que per alguns antimicrobians com ampicil·lina, no es va trobar gens que expliquessin la resistència en moltes soques, essent així que malgrat investigar la presencia dels mecanismes més freqüentment

descrits, a més del 50% de les soques els mecanismes de resistència a ampicil·lina no varen ser establerts, obrint la porta a que fossin altres mecanismes menys freqüents o sobretot a la implicació de les bombes d'expulsió en les diferents resistències reportades. El mateix comentari es pot fer pel que fa a la presencia de mecanismes involucrats a la resistència a trimetoprim.

Aquest article posa de manifest un fet ja descrit en Amèrica Llatina, que per tractar les infeccions per bacteris gramnegatius, no hi ha opcions terapèutiques adequades, i la seva importància es clau tant en infeccions comunitàries com hospitalàries. [162]

En el segon article, sorpresos per l'elevada resistència trobada en aquestes soques de la perifèria de Lima, es va procedir a estudiar els nivells de resistència a antimicrobians en les soques comensals, desenvolupant en el tercer article, estudis dels mecanismes moleculars tant en soques comensals com en diarreogèniques.

En el treball es realitzà un estudi més a fons de la resistència a quinolones, observant la distribució dels nivells de susceptibilitat segons franges d'edat, sobretot, perquè segons el manuals clínics a Lima, i tot i haver-se mostrat segurs l'ús en infants, són una família d'antimicrobians amb un ús molt limitat en nens. [163, 164] Tanmateix s'analitzaren els mecanismes moleculars de resistència a quinolones segons patogenicitat, buscant si hi havia diferències entre la presència de mecanismes i el caràcter diarreogènic de les soques estudiades.

Els resultats referent a la presència de mecanismes moleculars de la resistència a quinolones, reforcen els resultats obtinguts en estudis relacionats a Lima, [112] o en altres regions properes d'Amèrica Llatina on es descriu que els TMQR més freqüents són *aac(6')-Ib-cr* i *qnrB*. [101, 111] Concretament en soques d'*E. coli* comensals de Bolívia es descriu també la presència d'aquests mecanismes i per primera vegada, es reporta la presència del gen *qepA* en mostres comensals amb presència de $bla_{CTX\text{-}M.}$ [111] En estudis realitzats a l'Argentina, [114] es mostra elevada resistència a quinolones lligada també a la presència de resistència a cefalosporines (concretament

a les oximino-cefalosporines), on els TMQR trobats en més freqüència eren amb el 42,4% (14/33) *aac(6')Ib-cr*, el 33,3% (11/33) *qnrB* i un 24,3% dels casos que presentaven ambdós mecanismes de manera concomitant. Destacar que tot i que els nostres estudis no han realitzat caracterització de les variants del gen *qnrB*, en estudis similars, a Amèrica Llatina es descriu una elevat nombre de variants del gen *qnrB* (*qnrB2*, *qnrB19*, *qnrB10*, *qnrB1* i *qnrB6*) i, recentment s'ha proposat una distribució diferencial dels TMQR segons l'origen de les espècies, comunitàries o hospitalàries, i es vincula sobretot a la presència d'elements genètics mòbils tipus integrons. [101, 114]

Tornant als estudis d'aquesta tesi, van aportar dades de que els elevats nivells de resistències, es devien a la pressió externa, i no a la pressió directe del propi tractament. Concordant amb estudis en comunitats aïllades, l'Amazònia, amb l'aparició de resistències, sense exposició a quinolones, [165] que demostren que no cal que hi hagi un consum directe d'antimicrobians per trobar resistències en la comunitat. I així es reitera en un estudi realitzat a l'àrea periurbana de Lima, sobre el consum d'antibiòtics en infants, on es mostra que en nens menors d'1 any, els antibiòtics més usats són les penicil·lines (33%), seguit de macròlids (23.4%) i menys freqüent el cotrimoxazole i aminoglicòsids amb un 15,1% i 11,9% respectivament. Quan observem però els antimicrobians utilitzats per tractar la diarrea en aquesta franja d'edat, es mostra una predominança en l'ús de macròlids (49,6%), nitrofurans (24,8%) i finalment de cotrimoxazole (17,2%). Destacant que les quinolones només s'empren en un baix percentatge tant en diarrea com per tractar les patologies en general, amb un 2,4% i 1,2% respectivament. Reforçant la hipòtesis que l'elevada resistència a quinolones en les mostres dels nostres estudis, no provenen per l'ús directe d'aquest antibiòtic en aquesta franja d'edat. [146]

Els resultats referent a les soques comensals, segueixen la línia dels darrers anys en que es destaca la importància del paper que juguen les soques comensals en l'adquisició i disseminació de la resistència. S'ha descrit un augment continu de soques MDR provinents de la indústria alimentària, que ajudarien a disseminar els gens de resistència a microorganismes comensals humans, o patògens. [131]

En aquest sentit, estudis realitzats pel grup a posteriori, van investigar les resistències presents en bacteris aïllats provinent d'aliments de la zona, com a possible origen dels elevats nivells de resistències en aquesta comunitat, amb la hipòtesis que la cadena alimentària pot ser una via de transmissió de resistències a antibiòtics a la comunitat de Lima. Aquest estudi realitzat pel nostre grup, va trobar una elevada resistència en soques aïllades d'aliments d'origen càrnic (pollastre, porc i vedella) provinents de mercats a la mateixa ciutat i perifèria de Lima. Concretament en soques d'*E. coli* es van trobar valors de 99,5% de resistència a rifampicina, 75,7% a tetraciclina, 74,3% a ampicil·lina, 59,8% a cotrimoxazole, i també a la família de les quinolones amb 56,7 % de resistència a àc. nalidixic i 39,2% a ciprofloxacina. A més a més un 37,1% de resistència a cloramfenicol. Referent a antibiòtics d'ús més recent, un 11,34% a furazolidona i un 5,2% a azitromicina. [166] De la mateixa manera les soques de *Salmonella* spp. aïllades principalment en mostres de pollastre, presentaren elevats nivell de resistència, destacant amb un 100% la resistència a furazolidona. [167] Tanmateix a aquestes soques es detectà una inusual freqüència de BLEEs pertanyents als grups $bla_{CTX\text{-}M}$ i $bla_{SHV.}$ [167] Aquestes dades, suporten la possibilitat que els nivells de resistència a la comunitat de Perú poden seguir augmentant; lligant-ho amb les dades de BLEEs trobades a *Salmonellas* de mostres alimentàries, cal fer esment de la recent detecció de brots de diarrea causades per soques multiresistents de S*almonella enterica* serovar Infantis portadores de del gen $bla_{CTX\text{-}M\ 9}$ [167] i de la molt més preocupant elevadíssima freqüència, prop del 75%, de *Klebsiella* spp. com de *E. coli* aïllades, portadores de gens BLEEs en soques provinents de bacterièmies en Hospitals de Lima.[168] i en general a l'Amèrica Llatina. [169] En aquest context amenaçador per les teràpies antimicrobianes cal destacar l'elevat valor terapèutic que presenten els carbapenems en aquest país, de moment, pel tractament de moltes infeccions. Tot i que, amb prudència, ja que les resistències a carbapenems estan en augment a nivell mundial, i a diferents hospitals de Lima, ja s'han començat a detectar enterobacteris portadors de carbapenemases, [170] per la qual cosa cal estar alerta.

La suma dels presents resultats que mostren els elevats nivells d'antimicrobians en la població infantil, tant en patògens com comensals, i els resultats obtesos per Ruiz L *et al*. [166] en analitzar mostres d'origen alimentari, reforça la necessitat d'implementar

un control en venta i ús d'antibiòtics tant per humans com en veterinària al països de mitja-baixa renda.

Hi ha una necessitat d'establir lleis per regular l'ús d'antimicrobians en veterinària, per "salvar" els antibiòtics exclusius d'ús en humans que siguin més eficients, tal i com recomana la OMS. [39] És important establir una normativa única mundial, perquè fins hi tot en països que tenen lleis explícites més restrictives, no les apliquen a l'hora d'importar aliments, que, com s'ha demostrat, poden ser portadors de microorganismes amb resistència a antimicrobians, podent contribuir a l'expansió de les resistències a antibiòtics a nivell internacional. En aquest sentit cal fer esment, que fins al moment, a Perú no existeix una regulació en l'ús d'aquestes substàncies en veterinària. Al respecte és interessant indicar que a un estudi realitzat recentment pel nostre grup analitzant soques d'*E. coli* d'origen veterinari, aquelles provinents d'animals criats a granges legals, presentaven, en general, majors nivells de resistència a antimicrobians que aquells animals criats a granges "informals" o per autoconsum, suggerint que part del problema del desenvolupament de resistències en aquest ambient ecològic està relacionat amb el tipus d'alimentació dels animals.

En el cas concret de Perú, consta com un dels països que més ha augmentat el seu consum d'antimicrobians de l'Amèrica Llatina en els últims anys, en especial la ciprofloxacina, [171] mostrant nivells dramàticament alts de resistència a determinats antimicrobians, així com una elevada presència de BLEE en enterobacteris hospitalaris. [168, 169] Aquestes condicions fan que aquest país corri el risc de tot i tenir abastiment d'antimicrobians, i bons professionals en la salut, el seu nivell de resistències segueixi augmentant, posant en risc el futur dels tractaments antibiòtics del país.

Totes aquestes dades posen de manifest la necessitat de buscar alternatives de tractament, perquè les actuals ja estan limitades, amb els elevats nivells de resistència trobats a ampicil·lina i cotrimoxazole, àmpliament utilitzats en pediatria al país. [152] Com a conseqüència d'aquest fet, en aquest país s'està començant a parlar d'antimicrobians alternatius per tractar patologies infantils, com la diarrea, com seria el cas de l'azitromicina, la RFX, o la furazolidona. En el cas d'aquest últim, a Perú ja s'ha

començat a utilitzar com a tractament d'algunes patologies diarreiques d'origen bacterià. [146]

La primera part d'aquesta tesi doctoral es basava a estudiar la resistència a antimicrobians en soques aïllades com a causa de diarrea, i també en soques comensals en països amb un patró de consum d'antimicrobians característic, i on la diarrea segueix tenint un impacte greu en els infants, com és Perú. En la segona part es va voler avaluar, vist la gran importància de les resistències a antimicrobians en bacteris de gran rellevància en patologies intestinals, l'ús d'antibiòtics alternatius. Ja sigui nous fàrmacs, tot i que en els darrers anys no s'han descrit famílies noves d'antimicrobians, o buscant un nou ús o reintroduïnt antibiòtics que han quedat "oblidats" i que cal recuperar-los.
En aquest treball ens hem fixat en possibles alternatives com azitromicina o furazolidona , però, sobretot ens hem centrant en l'estudi de la RFX.

Es tenia la gran oportunitat d'estudiar les soques aïllades com a causa de diarrea en viatgers provinents del Servei de Medicina en Salut Internacional de l'Hospital Clínic de Barcelona. Cal recordar que la diarrea no només afecta a infants de països de mitja i baixa renda, sinó que és una patologia que causa una elevada morbiditat en viatgers que retornen de zones tropicals. [7] En aquesta col·lecció de soques, [172] s'observa l'evolució de la resistència a antimicrobians en el període 1995-2010, en soques provinents d'arreu del món. Donant una imatge de les resistències en cada una de les zones estudiades, el Carib, Amèrica Central, Amèrica del Sud Tropical, Nord Àfrica, Centra Àfrica, Àfrica de l'est, Àfrica de l'oest, Orient mitjà, subcontinent Indi i el Sud-est asiàtic.
Es considera que els microorganismes que causen la DV, són un mirall que reflexa la situació dels països visitats, fent que l'estudi del seu perfil de resistències, ens serveixi per obtenir informació dels països d'origen. Important tant a coneixement de la vigilància de resistència a nivell global, com per guiar els tractaments empírics amb antimicrobians en els casos que es requereixi. Destacar que sovint la informació a nivell de resistències en aquests països es baixa degut a la falta de dades..

En el present estudi, [172] al analitzar soques de *Shigella* spp. que presentaren elevats nivells de resistència als antimicrobians usats de manera convencional per tractar patologies intestinals, però es va aprofitar per fer un anàlisi dels nivells de resistència a nivell fenotípic davant antimicrobians alternatius, en aquest cas foren la azitromicina i la furazolidona.

L'azitromicina ha demostrat tenir una bona eficàcia en tractament de diarrea, i ja s'utilitza en alguns països de l'Amèrica Llatina. En aquest cas els nivells de resistència reportats foren baixos. En el cas de la furazolidona, els nivells també foren baixos, l'eficàcia també ha estat demostrada i ja s'utilitza per exemple a Perú per tractar determinats casos de diarrea infantil. A més a més aquesta substància té el valor de tenir un baix cost econòmic, i en un estudi recent *in vitro* demostra la seva baixa capacitat per seleccionar mutants, [173] ambdues característiques importants a l'hora d'escollir un antimicrobià en països de mitja-baixa renda.

Referent a la RFX, en un dels primers estudis s'avaluà la seva activitat *in vitro* davant patògens entèrics causant de diarrea del viatger, EAEC, ETEC i *Shigella*. [174] En estudis previs ja s'havia demostrat l'eficiència de RFX com a tractament de la DV, tan en regions concretes d'Amèrica [175], com també en regions més àmplies del món. [37] I ja s'havia descrit que presentava una eficàcia similar al cotrimoxazole o la ciprofloxacina. [37]

Al nostre estudi, [174] concentrant-se en soques ETEC, EAEC i de *S. sonnei* d'origen clínic aïllades com a causa de DV, es va observar que cap dels aïllats presentava una CMI major de 32 mg/l. Nivells molt baixos comparats amb altres antimicrobians, usats com a tractaments habituals, també estudiats en aquest treball: ampicil·lina, cotrimoxazole, cloramfenicol, tetraciclina, i, tot i que menys importants, les quinolones, i en línia amb resultats obtesos a l'inici del segle al nostre hospital. [121]

Per tant en aquest treball [174] es va concloure que la RFX podria ésser una bona alternativa de tractament per als principals causants de la DV, i sobretot en els casos on el viatger provenia de zones on la resistència a quinolones era molt elevada, com ja s'havia descrit a soques provinents del subcontinent Índi per exemple. [34] Sobretot es valorava l'opció d'usar RFX, recordem que no absorbible a nivell intestinal, per tractar

patologies intestinals i deixar d'utilitzar altres antimicrobians, com per exemple les fluoroquinolones, que són el tractament d'altres patologies com les del tracte urinari o infeccions del tracte respiratori. Com a valor afegit, es valorava el seu ús en infants i dones embarassades, on en el moment l'ús d'altres antimicrobians no era recomanat. [37]

L'estudi posterior de creació de mutants d'*E. coli* resistents a RFX, [176] va donar informació *in vitro*, sobre la RFX i la seva selecció de mutants. Es va observar que la RFX tenia un baix nivell de selecció de resistències, encara que quan aquestes es seleccionen, es creen en un sol pas i són altament estable en el temps. Però no s'observaren resistències creuades amb els altres antibiòtics testats: àc. nalidíxic, cloramfenicol i la ciprofloxacina i es suggeria la necessitat de futurs estudis per avaluar els mecanismes implicats en aquesta selecció de resistències.

L'estudi posterior, publicat a la revista MDR, [176] va posar sobre la taula els mecanismes moleculars implicats en l'adquisició d'aquest mecanismes. Principalment les mutacions en la diana, concretament al gen *rpoB*, i les bombes d'expulsió, ja que es va descartar el rol de les porines (OMP) en l'adquisició de resistència a RFX. Les mutacions en el gen *rpoB* es trobaren principalment en l'aminoàcid 516 i 526. Concretament el canvi D516Y, ja fou descrit prèviament en *Mycobacterium tuberculosis*, relacionat amb la resistència a rifampicina utilitzat en el tractament de la tuberculosi, però no s'havia descrit fins el moment en soques d'*E. coli*. Altres canvis foren trobats, que ja s'havien descrit en soques d'*E. coli* resistents a la rifamicina, com D516G, D516N i S512F. [177] Cal recordar que la creació d'aquestes mutacions al gen, fan que el bacteri esdevingui resistent, i que aquesta resistència sigui estable en el temps. Fet que resultarà que les soques resistents a RFX, encara que no estiguin sotmeses a una pressió externa com pot ser l'ús del propi antibiòtic, continuarien essent resistents, com es demostra en l'estudi anterior, que es veia que després de 20 passes consecutius sense antibiòtic, la resistència no revertia. Aquest fet juntament amb el que semblava que l'adquisició de la resistència a RFX no alterava la fitness del bacteri, i amb la "facilitat" de la RFX per obtenir mutants, comparat amb altres

antibiòtics com la ciprofloxacina, suggereix la necessitat de recomanar un sistema de vigilància de resistència amb l'ús de la RFX en clínica. Se li afegeix un altre punt interessant per controlar el seu ús, com és el fet que la RFX presenta una resistència creuada amb la rifampicina, antibiòtic d'elevada importància en ús clínic, utilitzat en teràpia estàndard per la tuberculosi, per profilaxi de meningitis o contra infeccions d'estafilococs. Aquest fet obriria les portes a que tractament per d'altres patologies tractades amb rifampicina, afectessin al tractament per a RFX, i tot i que la RFX no entra a la circulació sistèmica al ser quasi no absorbible, no hi ha estudis que demostrin que no interaccionaria amb les soques diana del tractament amb rifampicina.

Ja s'ha demostrat en estudis en coliforms i *Enterococci*, que un tractament amb RFX sembla no crear resistències en aquests microorganismes, fet potser explicable per l'elevada concentració de RFX a l'intestí, que pot arribar a ser de 4,000 a 8,000 μg/ g de femtes.[116]; el que juntament amb el fet que sembla ser que la RFX, tot i que les soques siguin resistents, presenta altres característiques com propietats imunomoduladores en l'intestí, [123] i capacitat per generar canvis tan en les cèl·lules de l'intestí, per evitar l'adhesió de determinats patògens,[124] com en l'expressió de factors de virulència en el bacteri, [123] faria que el seu ús en desordres intestinals fos recomenat, independent a la seva activitat bactericida.

Fins aleshores els estudis s'havien fet en mutants obtinguts *in vitro* o amb soques causants de DV. Així que com mostra l'últim article de Gomes *et al*. [178] es va passar a analitzar els nivells de sensibilitat i els mecanismes moleculars de resistència a la RFX d'aïllats clínics causants de diarrea infantil. Obtenint així informació de l'efectivitat de la possible aplicació de la RFX per tractaments de diarrea infantil a l'àrea o per un possible ús de la RFX com a tractament per a la diarrea en viatgers a Perú, amb l'esbiaixi, es clar, de que l'extrapolació dels resultats obtesos a aquestes soques clíniques mostren la realitat d'un àrea especifica i per tant serien necessaris estudis amb un nombre significatiu d'aïllats d'altres àrees del país per poder fer un treball rigorós. Els resultats foren sorprenents, amb valors de CMI superiors als trobats a estudis realitzats anteriorment, inclús en les soques comensals estudiades. S'ha pensat

en l'opció que els elevats nivells de resistència a les soques aïllades a l'àrea periurbana de Lima, podien ser el reflex d'una elevada pressió d'antimicrobians relacionats, com per exemple la rifampicina que s'utilitza com a tractament de la tuberculosi. Destacar que a la ciutat de Lima, la incidència de la tuberculosis és notable, de 134 x 100.000 habitants; aquest fet podria contribuir a que les soques bacterianes d'aquesta comunitat presentin elevades taxes de resistència a RFX. Malgrat aquesta hipòtesis, en l'article Gomes *et al* [178], es posà de manifest l'important paper de les bombes d'expulsió inhibides per PAβN com a causant de resistència a RFX en la majoria dels casos, quan l'esperable si el principal factor fos l'ús de rifampicina seria la presencia de mutacions al gen *rpoB*, que son mecanismes seleccionables de manera relativament fàcil, estables en el temps i resultarien en elevats nivells de resistència sense tenir un cost, si més no significatiu, pel que fa a la fitness bacteriana, com mostrà l'estudi anterior. [176] Així els resultats son suggestius de la presència d'una pressió selectiva al medi ambient, algun tipus de metall o restes de substàncies, que pugui induir que les bombes inhibibles per PAβN estiguin sobrepassades. Al respecte cal fer esment de la presència a la zona d'una zona humida (Pantanos de Villa) vorejada per diferents industries i de l'absència d'instal·lacions sanitàries i de proveïment d'aigua potable a la zona. Aquesta darrera es subministrada per camions cisternes i emmagatzemada en dipòsits, factors que podrien fer que l'aigua tingués alguna substància que influencies en el panorama de nivells i mecanismes de resistències, bàsicament bombes d'expulsió, descrits a aquest treball. Caldrien, però, futurs estudis enfocats a observar si a la regió hi ha presència d'algun tipus de substàncies capaces de desregular les bombes d'expulsió, i d'alguna manera seleccionessin soques multiresistents a diversos antimicrobians. Això podria relacionar-se amb el fet que també en l'article de Mosquito *et al.* [69] no es van trobar mecanismes per explicar moltes resistències a β-lactàmics i trimetoprim, tot i que en aquest cas no s'estudià el rol de la sobreexpressio de bombes d'expulsió.

CONCLUSIONS (Català)

Estudis en diarrea infantil a Lima:

- Les soques *E. coli* obtingudes en de nens menors de 5 anys de l'àrea periurbana de Lima, presenten uns nivells molt elevats de resistència a antimicrobians, sobretot als utilitzats de forma habitual en el tractament de patologies infantils. La presència de microorganismes multiresistents en soques comensals fou important, (91/222, 41,0%).

- Les soques comensals aïllades d'infants presentaven elevats nivells de resistència a ampicil·lina (62,6%), cotrimoxazole (48,6%), tetraciclina (43,0%) i cloramfenicol (15,8%). Fem èmfasi als alts nivells de resistència trobats a quinolones: 32% per l'àcid nalidíxic i 12% per ciprofloxacina significativament més alt que en soques patogèniques. En canvi les *E. coli* diarreogèniques eren significativament més resistents a cotrimoxazole.

- El fenotip més resistent, Nal^R i Cip^R, sorprenentment va ser trobat de manera més freqüent en soques aïllades de nens sans.

- No es va observar cap distribució diferencial dels mecanismes de resistència a quinolones en els diferents grups, DEC i no-DEC. Malgrat que el gen *aac(6')Ib-cr* es va detectar en major nombre en les soques DEC: 17 (34%) comparat amb les no-DEC (20%). El gen *qnrB* es va trobar en menys freqüència

- Les mutacions puntuals en els gens *gyrA* i *parC* juguen un paper rellevant en l'adquisició de resistència a quinolones en aquesta comunitat i ressaltar el paper important de les bombes d'expulsió en les resistències a antimicrobians.

Estudis en DV:

- Es va trobar una disminució dels casos de DV causada per *Shigella* en els últims anys. I les zones geogràfiques que presentaven majors casos de shigelosis, foren Àfrica de l'oest, el subcontinent Índi, Àfrica del nord i Amèrica Central

- Es va observar un ampli ventall de resistències en les soques de DV, sobretot alts nivells de resistència a la tetraciclina (84%), cotrimoxazole (75,5%), i ampicil·lina (45,5%). La resistència fou baixa a ciprofloxacina (2,1%), i als nous antibiòtics proposats com alternatives de tractament, com fou el cas de l'azitromicina (3,9%) i la furazolidona (8,4%).

- Les àrees com el Carib, Amèrica Central, el subcontinent índi, i el sud-est asiàtic presentaven un elevat percentatge de soques multiresistents.

Estudis de la RFX.:

- La Rfx posseïa una bona activitat *in vitro* en els patògens testats provinents de DV.

- En soques mutants *in vitro* la RFX presenta una freqüència de mutació relativament baixa, però més gran que amb ciprofloxacina, que no es van obtenir mutants.
- Els mutants obtinguts presentaven valors alts de MIC i eren estables en el temps.
- No es va observar resistència creuada entre aparició de resistència a RFX i els altres antibiòtics testats (cloramfenicol, àc. nalidíxic i ciprofloxacina).
- El paper més important en l'aparició de resistència a RFX són les mutacions en la diana i/o la sobreexpressió de les bombes d'expulsió. Mentrestant es va trobar una baixa freqüència de gens transferibles, *arr*, a l'àrea.

- Les soques comensals i diarreogèniques dels infants de Lima presentaven valors molt elevats de resistència a RFX, i les bombes d'expulsió inhibides per PAβN eren la causa de la resistència en la majoria dels casos.

CONCLUSIONS (English)

Studies on infant diarrhea in Lima:

- The *E. coli* strains obtained from children under 5 years old of the peri-urban area of Lima have very high levels of resistance to antimicrobials, especially those used routinely in the treatment of childhood diseases. Substantial multidrug resistant microorganisms were found (91/222 , 41.0%).

- Commensal strains isolated from children showed high levels of resistance to ampicillin (62.6%), cotrimoxazole (48.6%), tetracycline (43.0%) and chloramphenicol (15.8%). Is important to highlight the significantly levels of quinolone resistance found in pathogenic strains 32% to nalidixic acid and 12% to ciprofloxacin. However, pathogenic *E. coli* was significantly more resistant to cotrimoxazole.

- The more resistant phenotype, Nal^R and Cip^R was surprisingly found more frequently in strains isolated from healthy children.

- No differential distribution of the mechanisms of resistance to quinolones existed in different groups, DEC and non- DEC. Although the gene *aac (6') Ib-cr* was detected in greater numbers in DEC strains 17 (34%) compared to non-DEC (20 %). The *qnrB* gene was found in minor frequency.

- The role of target mutations in *gyrA* and *parC* was shown to be relevant in the acquisition of resistance to quinolones at the community. The role of efflux pump was shown to be important for antibiotic resistance.

Traveller's diarrhoea studies:

- In recent years, there was a decrease in TD cases produced by *Shigella* spp. The geographic areas with higher cases of shigellosis were West Africa, Indian Subcontinent, North Africa and Central America.

- A wide range of resistance strains in TD exists, especially high levels of resistance to tetracycline (84%), cotrimoxazole (75.5%), and ampicillin (45.5%). Resistance to ciprofloxacin was low (2.1 %), and also the antibiotic resistance was low in the new antibiotics proposed as alternatives: azithromycin (3.9 %) and furazolidone (8.4%).

- Areas as the Caribbean, Central America, Indian subcontinent and Southeast Asia have a high percentage of resistant strains.

Rifaximin studies:

- RFX showed good *in vitro* activity tested against pathogens from TD.

- The RFX mutant strains had a relatively low mutation rate, although higher than ciprofloxacin, which mutants were not obtained.

- Obtained mutants showed higher MIC values and were stable over time.

- No cross-resistance was observed between RFX and other antibiotics tested (chloramphenicol, ciprofloxacin and nalidixic acid).

- The more important roles in the emergence of RFX resistance were the target mutations and/or overexpression of efflux pump. While transferables gene, such as *arr*, were found in a low frequency in the Lima area.

- Comensal and pathogenic strains isolated among children in Lima showed very high levels of RFX resistance. And efflux pump inhibited by PAβN were in most cases the cause of resistance.

BIBLIOGRAFIA

1. Bryce, J., et al., *WHO estimates of the causes of death in children.* The Lancet, 2005. **365**(9465): p. 1147-1152.
2. UNICEF, W., *Diarrhea: why children are still dying and what can be done*. 2009, WHO. p. 68.
3. Hart, C.A., *Antibiotic resistance: an increasing problem?. It always has been, but there are things we can do.* BMJ, 1998. **316**(7140): p. 1255-6.
4. Croxen, M.A., et al., *Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia coli.* Clin Microbiol Rev. **26**(4): p. 822-80.
5. Greenwood, Z., et al., *Gastrointestinal Infection Among International Travelers Globally.* Journal of Travel Medicine, 2008. **15**(4): p. 221-228.
6. Steffen, R., *Epidemiology of traveler's diarrhea.* Clin Infect Dis, 2005. **41 Suppl 8**: p. S536-40.
7. Gascon, J., *Epidemiology, etiology and pathophysiology of traveler's diarrhea.* Digestion, 2006. **73 Suppl 1**: p. 102-8.
8. Lanata, C.F., et al., *Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review.* PLoS One, 2013. **8**(9): p. e72788.
9. Kotloff, K.L., et al., *Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study.* Lancet, 2013. **382**(9888): p. 209-22.
10. CDC, *Health Information for International Travel. Yellow book*. 2014.
11. Hill, D.R., et al., *The practice of travel medicine: guidelines by the Infectious Diseases Society of America.* Clin Infect Dis, 2006. **43**(12): p. 1499-539.
12. Croxen, M.A. and B.B. Finlay, *Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity.* Nat Rev Microbiol, 2009. **8**(1): p. 26-38.
13. Okeke, I.N., *Diarrheagenic Escherichia coli in sub-Saharan Africa: status, uncertainties and necessities.* J Infect Dev Ctries, 2009. **3**(11): p. 817-42.
14. Rasko, D.A., et al., *Origins of the E. coli strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany.* N Engl J Med, 2011. **365**(8): p. 709-17.
15. Martinez-Medina, M., et al., *Similarity and divergence among adherent-invasive Escherichia coli and extraintestinal pathogenic E. coli strains.* J Clin Microbiol, 2009. **47**(12): p. 3968-79.
16. Nataro, J.P. and J.B. Kaper, *Diarrheagenic Escherichia coli.* Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(1): p. 142-201.
17. Tzipori, S., et al., *Studies with enteroaggregative Escherichia coli in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model.* Infect Immun, 1992. **60**(12): p. 5302-6.
18. Franca, F.L., et al., *Genotypic and phenotypic characterisation of enteroaggregative Escherichia coli from children in Rio de Janeiro, Brazil.* PLoS One, 2013. **8**(7): p. e69971.
19. Huang, D.B., H. Koo, and H.L. DuPont, *Enteroaggregative Escherichia coli: An Emerging Pathogen.* Curr Infect Dis Rep, 2004. **6**(2): p. 83-86.
20. Philipson, C.W., J. Bassaganya-Riera, and R. Hontecillas, *Animal models of enteroaggregative Escherichia coli infection.* Gut Microbes, 2013. **4**(4): p. 281-91.
21. Arduino, R.C. and H.L. DuPont, *Travellers' diarrhoea.* Baillieres Clin Gastroenterol, 1993. **7**(2): p. 365-85.

22. Black, R.E., *Epidemiology of travelers' diarrhea and relative importance of various pathogens.* Rev Infect Dis, 1990. **12 Suppl 1**: p. S73-9.
23. Ooka, T., et al., *Clinical significance of Escherichia albertii.* Emerg Infect Dis, 2012. **18**(3): p. 488-92.
24. Ochoa, T.J. and C.A. Contreras, *Enteropathogenic escherichia coli infection in children.* Curr Opin Infect Dis, 2011. **24**(5): p. 478-83.
25. Nataro, J.P., et al., *ESCHERICHIA COLIA, SHIGELLA AND SALMONELLA.* In Manual of 2007.
26. Kotloff, K.L., et al., *Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies.* Bull World Health Organ, 1999. **77**(8): p. 651-66.
27. Ashkenazi, S., *Shigella infections in children: new insights.* Semin Pediatr Infect Dis, 2004. **15**(4): p. 246-52.
28. Niyogi, S.K., *Shigellosis.* J Microbiol, 2005. **43**(2): p. 133-43.
29. QSM, *WHO Drug Information*. 2013. p. 93.
30. Faure, C., *Role of antidiarrhoeal drugs as adjunctive therapies for acute diarrhoea in children.* Int J Pediatr, 2013. **2013**: p. 612403.
31. Pickering, L.K., *Antimicrobial resistance among enteric pathogens.* Semin Pediatr Infect Dis, 2004. **15**(2): p. 71-7.
32. Castelli, F., et al., *Prevention and treatment of traveler's diarrhea. Focus on antimicrobial agents.* Digestion, 2006. **73 Suppl 1**: p. 109-18.
33. Ruiz, J., et al., *Trends in antimicrobial resistance in Campylobacter spp. causing traveler's diarrhea.* APMIS, 2007. **115**(3): p. 218-24.
34. Mensa, L., et al., *Quinolone resistance among Shigella spp. isolated from travellers returning from India.* Clin Microbiol Infect, 2008. **14**(3): p. 279-81.
35. Koo, H.L., H.L. Dupont, and D.B. Huang, *The role of rifaximin in the treatment and chemoprophylaxis of travelers' diarrhea.* Ther Clin Risk Manag, 2009. **5**: p. 841-8.
36. Zanger, P., et al., *Effectiveness of rifaximin in prevention of diarrhoea in individuals travelling to south and southeast Asia: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial.* Lancet Infect Dis, 2013. **13**(11): p. 946-54.
37. Steffen, R., et al., *Therapy of travelers' diarrhea with rifaximin on various continents.* Am J Gastroenterol, 2003. **98**(5): p. 1073-8.
38. OMS, *Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos.* 2001.
39. WHO, *The evolving threat of antimicrobial resistance. Options for action*. 2012: Geneva, Switzerland.
40. ECDPC, *EU action on Antimicrobial Resistance -European Antibiotic Awareness Day* E.C.f.D.P.a. Control, Editor. 2012: Brussels p. 7.
41. CDC, *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013*. 2013, Center for Diseases Control and Prevention. p. 112.
42. Andersson, D.I. and D. Hughes, *Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?* Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(4): p. 260-71.
43. Davies, R., *Antibiotic prophylaxis.* Br Dent J, 1994. **176**(4): p. 126-7.
44. van Hoek, A.H., et al., *Acquired antibiotic resistance genes: an overview.* Front Microbiol, 2011. **2**: p. 203.

45. Abraham, E.P. and E. Chain, *An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940.* Rev Infect Dis, 1988. **10**(4): p. 677-8.
46. Wright, G.D., *Aminoglycoside-modifying enzymes.* Curr Opin Microbiol, 1999. **2**(5): p. 499-503.
47. D'Costa, V.M., et al., *Antibiotic resistance is ancient.* Nature, 2011. **477**(7365): p. 457-61.
48. Spratt, B.G., *Resistance to antibiotics mediated by target alterations.* Science, 1994. **264**(5157): p. 388-93.
49. Wright, G.D., *Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification.* Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(10): p. 1451-70.
50. Burton, B. and D. Dubnau, *Membrane-associated DNA transport machines.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(7): p. a000406.
51. Willi, K., et al., *Transduction of antibiotic resistance markers among Actinobacillus actinomycetemcomitans strains by temperate bacteriophages Aa phi 23.* Cell Mol Life Sci, 1997. **53**(11-12): p. 904-10.
52. Smillie, C., et al., *Mobility of plasmids.* Microbiol Mol Biol Rev, 2010. **74**(3): p. 434-52.
53. Carattoli, A., *Plasmids and the spread of resistance.* Int J Med Microbiol, 2013. **303**(6-7): p. 298-304.
54. Carattoli, A., *Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids.* Int J Med Microbiol. **301**(8): p. 654-8.
55. Carattoli, A., et al., *Identification of plasmids by PCR-based replicon typing.* J Microbiol Methods, 2005. **63**(3): p. 219-28.
56. Couturier, M., et al., *Identification and classification of bacterial plasmids.* Microbiol Rev, 1988. **52**(3): p. 375-95.
57. Carattoli, A., *Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae.* Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(6): p. 2227-38.
58. Sabate, M. and G. Prats, *[Structure and function of integrons].* Enferm Infecc Microbiol Clin, 2002. **20**(7): p. 341-5.
59. Carattoli, A., *Importance of integrons in the diffusion of resistance.* Vet Res, 2001. **32**(3-4): p. 243-59.
60. Neu, H.C., et al., *Antibiotic resistance. Epidemiology and therapeutics.* Diagn Microbiol Infect Dis, 1992. **15**(2 Suppl): p. 53S-60S.
61. Karami, N., et al., *Tetracycline resistance in Escherichia coli and persistence in the infantile colonic microbiota.* Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(1): p. 156-61.
62. Chopra, I. and M. Roberts, *Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance.* Microbiol Mol Biol Rev, 2001. **65**(2): p. 232-60 ; second page, table of contents.
63. Vakulenko, S.B., et al., *Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci.* Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(4): p. 1423-6.
64. Schatz, A., E. Bugie, and S.A. Waksman, *Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. 1944.* Clin Orthop Relat Res, 2005(437): p. 3-6.
65. Hancock, R.E., *Aminoglycoside uptake and mode of action-with special reference to streptomycin and gentamicin. II. Effects of aminoglycosides on cells.* J Antimicrob Chemother, 1981. **8**(6): p. 429-45.

66. Poehlsgaard, J. and S. Douthwaite, *The bacterial ribosome as a target for antibiotics.* Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(11): p. 870-81.
67. Ramirez, M.S. and M.E. Tolmasky, *Aminoglycoside modifying enzymes.* Drug Resist Updat, 2010. **13**(6): p. 151-71.
68. Schwarz, S., et al., *Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol.* FEMS Microbiol Rev, 2004. **28**(5): p. 519-42.
69. Mosquito, S., et al., *[Molecular mechanisms of antibiotic resistance in Escherichia coli- associated diarrhea].* Rev Peru Med Exp Salud Publica, 2012. **28**(4): p. 648-56.
70. Kong, K.F., L. Schneper, and K. Mathee, *Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology.* APMIS, 2010. **118**(1): p. 1-36.
71. Bush, K., G.A. Jacoby, and A.A. Medeiros, *A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure.* Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(6): p. 1211-33.
72. D'Andrea, M.M., et al., *CTX-M-type beta-lactamases: a successful story of antibiotic resistance.* Int J Med Microbiol, 2013. **303**(6-7): p. 305-17.
73. Munoz-Price, L.S., et al., *Clinical epidemiology of the global expansion of Klebsiella pneumoniae carbapenemases.* Lancet Infect Dis, 2013. **13**(9): p. 785-96.
74. Douthwaite, S. and W.S. Champney, *Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site.* J Antimicrob Chemother, 2001. **48 Suppl T1**: p. 1-8.
75. Gomes, C., et al., *In vitro development and analysis of Escherichia coli and Shigella boydii azithromycin-resistant mutants.* Microb Drug Resist, 2012. **19**(2): p. 88-93.
76. von Konig, C.H., *Use of antibiotics in the prevention and treatment of pertussis.* Pediatr Infect Dis J, 2005. **24**(5 Suppl): p. S66-8.
77. Infante, B., et al., *Acquired sulphonamide resistance genes in faecal Escherichia coli from healthy children in Bolivia and Peru.* Int J Antimicrob Agents, 2005. **25**(4): p. 308-12.
78. Ho, P.L., et al., *Distribution of integron-associated trimethoprim-sulfamethoxazole resistance determinants among Escherichia coli from humans and food-producing animals.* Lett Appl Microbiol, 2009. **49**(5): p. 627-34.
79. Dahmen, S., et al., *Distribution of cotrimoxazole resistance genes associated with class 1 integrons in clinical isolates of Enterobacteriaceae in a university hospital in Tunisia.* Microb Drug Resist, 2009. **16**(1): p. 43-7.
80. Emmerson, A.M. and A.M. Jones, *The quinolones: decades of development and use.* J Antimicrob Chemother, 2003. **51 Suppl 1**: p. 13-20.
81. Lesher, G.Y., et al., *1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents.* J Med Pharm Chem, 1962. **91**: p. 1063-5.
82. Domagala, J.M., et al., *5-Amino-7-(3-amino-1-pyrrolidinyl)-1-cyclopropyl-6,8-difluoro-1,4- dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid (PD 124,816). Synthesis and biological evaluation of a new class of quinolone antibacterials.* Drugs Exp Clin Res, 1988. **14**(7): p. 453-60.
83. Bolon, M.K., *The newer fluoroquinolones.* Infect Dis Clin North Am, 2009. **23**(4): p. 1027-51, x.

84. Ruiz, J., *Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection.* J Antimicrob Chemother, 2003. **51**(5): p. 1109-17.
85. Piddock, L.J., et al., *Quinolone accumulation by Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus and Escherichia coli.* J Antimicrob Chemother, 1999. **43**(1): p. 61-70.
86. Wigley, D.B., *Structure and mechanism of DNA topoisomerases.* Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1995. **24**: p. 185-208.
87. Hooper, D.C., *Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci.* Lancet Infect Dis, 2002. **2**(9): p. 530-8.
88. Drlica, K. and X. Zhao, *DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones.* Microbiol Mol Biol Rev, 1997. **61**(3): p. 377-92.
89. Horowitz, D.S. and J.C. Wang, *Mapping the active site tyrosine of Escherichia coli DNA gyrase.* J Biol Chem, 1987. **262**(11): p. 5339-44.
90. Madurga, S., et al., *Mechanism of binding of fluoroquinolones to the quinolone resistance-determining region of DNA gyrase: towards an understanding of the molecular basis of quinolone resistance.* Chembiochem, 2008. **9**(13): p. 2081-6.
91. Nakamura, S., et al., *gyrA and gyrB mutations in quinolone-resistant strains of Escherichia coli.* Antimicrob Agents Chemother, 1989. **33**(2): p. 254-5.
92. Everett, M.J., et al., *Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 Escherichia coli strains isolated from humans and animals.* Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(10): p. 2380-6.
93. Yoshida, H., et al., *Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrB gene of Escherichia coli.* Antimicrob Agents Chemother, 1991. **35**(8): p. 1647-50.
94. Ruiz, J., et al., *The region of the parE gene, homologous to the quinolone-resistant determining region of the gyrB gene, is not linked with the acquisition of quinolone resistance in Escherichia coli clinical isolates.* J Antimicrob Chemother, 1997. **39**(6): p. 839-40.
95. Mitsuyama, J., et al., *In vitro antibacterial activities of tosufloxacin against and uptake of tosufloxacin by outer membrane mutants of Escherichia coli, Proteus mirabilis, and Salmonella typhimurium.* Antimicrob Agents Chemother, 1992. **36**(9): p. 2030-6.
96. Nikaido, H., *Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux.* Science, 1994. **264**(5157): p. 382-8.
97. Martinez-Martinez, L., A. Pascual, and G.A. Jacoby, *Quinolone resistance from a transferable plasmid.* Lancet, 1998. **351**(9105): p. 797-9.
98. Robicsek, A., G.A. Jacoby, and D.C. Hooper, *The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance.* Lancet Infect Dis, 2006. **6**(10): p. 629-40.
99. Jacoby, G.A., et al., *Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes.* Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(4): p. 1665-6.
100. Strahilevitz, J., et al., *Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat.* Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(4): p. 664-89.
101. Andres, P., et al., *Differential distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical enterobacteria with unusual phenotypes of*

quinolone susceptibility from Argentina. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(6): p. 2467-75.
102. Poirel, L., V. Cattoir, and P. Nordmann, *Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies.* Front Microbiol, 2012. **3**: p. 24.
103. Rodriguez-Martinez, J.M., et al., *Plasmid-mediated quinolone resistance: an update.* J Infect Chemother, 2010. **17**(2): p. 149-82.
104. Robicsek, A., et al., *Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase.* Nat Med, 2006. **12**(1): p. 83-8.
105. de Toro, M., et al., *pMdT1, a small ColE1-like plasmid mobilizing a new variant of the aac(6')-Ib-cr gene in Salmonella enterica serovar Typhimurium.* J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(6): p. 1277-80.
106. Yamane, K., et al., *New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an Escherichia coli clinical isolate.* Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(9): p. 3354-60.
107. Rodriguez-Martinez, J.M., et al., *Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae.* J Antimicrob Chemother. **68**(1): p. 68-73.
108. Hansen, L.H., et al., *Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in Escherichia coli and selected enteric bacteria.* J Antimicrob Chemother, 2007. **60**(1): p. 145-7.
109. Yuan, J., et al., *Prevalence of the oqxAB gene complex in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli clinical isolates.* J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(7): p. 1655-9.
110. Kim, H.B., et al., *Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period.* Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(2): p. 639-45.
111. Bartoloni, A., et al., *Relentless increase of resistance to fluoroquinolones and expanded-spectrum cephalosporins in Escherichia coli: 20 years of surveillance in resource-limited settings from Latin America.* Clin Microbiol Infect, 2012. **19**(4): p. 356-61.
112. Riveros, M., et al., *Plasmid-mediated quinolone resistance genes in enteroaggregative Escherichia coli from infants in Lima, Peru.* Int J Antimicrob Agents, 2012. **39**(6): p. 540-2.
113. Pallecchi, L., et al., *Small qnrB-harbouring ColE-like plasmids widespread in commensal enterobacteria from a remote Amazonas population not exposed to antibiotics.* J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(5): p. 1176-8.
114. Cruz, G.R., et al., *Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among oxyiminocephalosporin-resistant Enterobacteriaceae in Argentina.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 2013. **108**(7): p. 924-7.
115. Huang, D.B. and H.L. DuPont, *Rifaximin--a novel antimicrobial for enteric infections.* J Infect, 2005. **50**(2): p. 97-106.
116. Scarpignato, C. and I. Pelosini, *Rifaximin, a poorly absorbed antibiotic: pharmacology and clinical potential.* Chemotherapy, 2005. **51 Suppl 1**: p. 36-66.
117. Hong, K.S. and J.S. Kim, *Rifaximin for the treatment of acute infectious diarrhea.* Therap Adv Gastroenterol, 2011. **4**(4): p. 227-35.

118. Koo, H.L. and H.L. DuPont, *Rifaximin: a unique gastrointestinal-selective antibiotic for enteric diseases.* Curr Opin Gastroenterol, 2009. **26**(1): p. 17-25.
119. Alvisi, V., et al., *Rifaximin, a rifamycin derivative for use in the treatment of intestinal bacterial infections in seriously disabled patients.* J Int Med Res, 1987. **15**(1): p. 49-56.
120. DuPont, H.L., *Biologic properties and clinical uses of rifaximin.* Expert Opin Pharmacother, 2011. **12**(2): p. 293-302.
121. Sierra, J.M., et al., *In vitro activity of rifaximin against enteropathogens producing traveler's diarrhea.* Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(2): p. 643--4.
122. Layer, P. and V. Andresen, *Review article: rifaximin, a minimally absorbed oral antibacterial, for the treatment of travellers' diarrhoea.* Aliment Pharmacol Ther, 2010. **31**(11): p. 1155-64.
123. Jiang, Z.D., S. Ke, and H.L. Dupont, *Rifaximin-induced alteration of virulence of diarrhoea-producing Escherichia coli and Shigella sonnei.* Int J Antimicrob Agents, 2010. **35**(3): p. 278-81.
124. Schrodt, C., et al., *Rifaximin-mediated changes to the epithelial cell proteome: 2-D gel analysis.* PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68550.
125. DuPont, H.L. and Z.D. Jiang, *Influence of rifaximin treatment on the susceptibility of intestinal Gram-negative flora and enterococci.* Clin Microbiol Infect, 2004. **10**(11): p. 1009-11.
126. Xu, D., et al., *Rifaximin Alters Intestinal Bacteria and Prevents Stress-Induced Gut Inflammation and Visceral Hyperalgesia in Rats.* Gastroenterology, 2013.
127. Severinov, K., et al., *Rifampicin region revisited. New rifampicin-resistant and streptolydigin-resistant mutants in the beta subunit of Escherichia coli RNA polymerase.* J Biol Chem, 1993. **268**(20): p. 14820-5.
128. Baysarowich, J., et al., *Rifamycin antibiotic resistance by ADP-ribosylation: Structure and diversity of Arr.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(12): p. 4886-91.
129. Hopkins, K.L., et al., *In-vitro activity of rifaximin against enteropathogenic bacteria isolated from travellers returning to the United Kingdom*. 2012, Clin. Microbiol. Infect.
130. Sulavik, M.C., et al., *Antibiotic susceptibility profiles of Escherichia coli strains lacking multidrug efflux pump genes.* Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(4): p. 1126-36.
131. Szmolka, A. and B. Nagy, *Multidrug resistant commensal Escherichia coli in animals and its impact for public health.* Front Microbiol, 2013. **4**: p. 258.
132. Webber, M.A. and L.J. Piddock, *The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance.* J Antimicrob Chemother, 2003. **51**(1): p. 9-11.
133. Piddock, L.J., *Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria.* Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(2): p. 382-402.
134. Lomovskaya, O. and K.A. Bostian, *Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic--a vision for applied use.* Biochem Pharmacol, 2006. **71**(7): p. 910-8.
135. Stavri, M., L.J. Piddock, and S. Gibbons, *Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources.* J Antimicrob Chemother, 2007. **59**(6): p. 1247-60.

136. Li, B., et al., *Artesunate enhances the antibacterial effect of {beta}-lactam antibiotics against Escherichia coli by increasing antibiotic accumulation via inhibition of the multidrug efflux pump system AcrAB-TolC.* J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(4): p. 769-77.
137. Kothary, V., et al., *Rifaximin resistance in Escherichia coli associated with inflammatory bowel disease correlates with prior rifaximin use, mutations in rpoB, and activity of Phe-Arg-beta-naphthylamide-inhibitable efflux pumps.* Antimicrob Agents Chemother, 2012. **57**(2): p. 811-7.
138. Piddock, L.J., et al., *Natural and synthetic compounds such as trimethoprim behave as inhibitors of efflux in Gram-negative bacteria.* J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(6): p. 1215-23.
139. Pannek, S., et al., *Multidrug efflux inhibition in Acinetobacter baumannii: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-beta-naphthylamide.* J Antimicrob Chemother, 2006. **57**(5): p. 970-4.
140. Saenz, Y., et al., *Effect of the efflux pump inhibitor Phe-Arg-beta-naphthylamide on the MIC values of the quinolones, tetracycline and chloramphenicol, in Escherichia coli isolates of different origin.* J Antimicrob Chemother, 2004. **53**(3): p. 544-5.
141. Koluman, A. and A. Dikici, *Antimicrobial resistance of emerging foodborne pathogens: status quo and global trends.* Crit Rev Microbiol, 2012. **39**(1): p. 57-69.
142. Raipal, D.K. and J.R. Brown, *Modulating the human gut microbiomes as an emerging therapeutic paradigm.* Sci Prog, 2013. **3**: p. 224-36.
143. Vila, J.P., T., *Update on Antibacterial Resistance in Low-Income Countries: Factors Favoring the Emergence of Resistance.* The Open Infectious Diseases, 2010. **4**: p. 38-54.
144. Sosa, A.J., et al., *Antimicrobial Resistance in Developing Countries*. 2010, London: Springer New York Dordrecht Heidelberg London.
145. Radyowijati, A. and H. Haak, *Improving antibiotic use in low-income countries: an overview of evidence on determinants.* Soc Sci Med, 2003. **57**(4): p. 733-44.
146. Ecker, L., et al., *Physicians' responsibility for antibiotic use in infants from periurban Lima, Peru.* Rev Panam Salud Publica, 2012. **30**(6): p. 574-9.
147. Ecker, L., et al., *Factors affecting caregivers' use of antibiotics available without a prescription in Peru.* Pediatrics, 2013. **131**(6): p. e1771-9.
148. Okeke, I.N., et al., *Antimicrobial resistance in developing countries. Part II: strategies for containment.* Lancet Infect Dis, 2005. **5**(9): p. 568-80.
149. Mandomando, I., et al., *Antimicrobial resistance of Vibrio cholerae O1 serotype Ogawa isolated in Manhica District Hospital, southern Mozambique.* J Antimicrob Chemother, 2007. **60**(3): p. 662-4.
150. Navia, M.M., et al., *Analysis of the mechanisms of quinolone resistance in clinical isolates of Citrobacter freundii.* J Antimicrob Chemother, 1999. **44**(6): p. 743-8.
151. Pazhani, G.P., et al., *Species diversity and antimicrobial resistance of Shigella spp. isolated between 2001 and 2004 from hospitalized children with diarrhoea in Kolkata (Calcutta), India.* Epidemiol Infect, 2005. **133**(6): p. 1089-95.

152. Ochoa, T.J., et al., *High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic Escherichia coli in infants in Peru.* Am J Trop Med Hyg, 2009. **81**(2): p. 296-301.
153. *Indicadores básicos. 2012*, D.G.d. epidemiologia, Editor. 2012, Ministerio de Salud: Lima, Perú.
154. Ochoa, T.J., et al., *Age-related susceptibility to infection with diarrheagenic Escherichia coli among infants from Periurban areas in Lima, Peru.* Clin Infect Dis, 2009. **49**(11): p. 1694-702.
155. Barletta, F., et al., *Validation of five-colony pool analysis using multiplex real-time PCR for detection of diarrheagenic Escherichia coli.* J Clin Microbiol, 2009. **47**(6): p. 1915-7.
156. Alonso, D., et al., *Salmonella ovarian abscess following travel diarrhoea episode.* Arch Gynecol Obstet, 2007. **276**(5): p. 551-3.
157. Gonzales, L., et al., *Prevalence, seasonality and severity of disease caused by pathogenic Escherichia coli in children with diarrhoea in Bolivia.* J Med Microbiol, 2013. **62**(Pt 11): p. 1697-706.
158. Garcia, P.G., V.L. Silva, and C.G. Diniz, *Occurrence and antimicrobial drug susceptibility patterns of commensal and diarrheagenic Escherichia coli in fecal microbiota from children with and without acute diarrhea.* J Microbiol. **49**(1): p. 46-52.
159. Sang, W.K., V. Oundo, and D. Schnabel, *Prevalence and antibiotic resistance of bacterial pathogens isolated from childhood diarrhoea in four provinces of Kenya.* J Infect Dev Ctries, 2012. **6**(7): p. 572-8.
160. Meng, C.Y., et al., *Etiology of diarrhea in young children and patterns of antibiotic resistance in Cambodia.* Pediatr Infect Dis J, 2011. **30**(4): p. 331-5.
161. Aggarwal, P., et al., *Highly-resistant E. coli as a common cause of paediatric diarrhoea in India.* J Health Popul Nutr, 2013. **31**(3): p. 409-12.
162. Casellas, J.M., *[Antibacterial drug resistance in Latin America: consequences for infectious disease control].* Rev Panam Salud Publica, 2012. **30**(6): p. 519-28.
163. Ecker, L., et al., *Physicians' responsibility for antibiotic use in infants from periurban Lima, Peru.* Rev Panam Salud Publica. **30**(6): p. 574-9.
164. Murray, T.S. and R.S. Baltimore, *Pediatric uses of fluoroquinolone antibiotics.* Pediatr Ann, 2007. **36**(6): p. 336-42.
165. Bartoloni, A., et al., *Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community.* Int J Antimicrob Agents, 2009. **33**(2): p. 125-9.
166. Ruiz, L., et al., *High antimicrobial-resistance levels of Escherichia coli isolated from meat of several markets in Lima, Peru*, t.E.C.o.T.M.a.I. Health, Editor. 2013: Copenhaguen, Denmark.
167. Riveros, M., et al., *Brote de Salmonella spp portadoras de β-Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en heces en niños menores de 6 Años con diarrea*, V.C.C.I.d.I.N.d. Salud, Editor. 2013: Lima, Perú.
168. Garcia, C., et al., *Antimicrobial drug resistance in Peru.* Emerg Infect Dis, 2012. **18**(3): p. 520-1.
169. Guzman-Blanco, M., et al., *Extended spectrum beta-lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America.* Braz J Infect Dis, 2014.

170. Velásquez, J., et al., *Klebsiella pneumoniae resistente a los carbapenemes. Primer caso de carbapenemasa tipo KPC en Perú.* Rev Soc Peru Med Interna, 2013. **26**(4): p. 192-196.
171. Wirtz, V.J., A. Dreser, and R. Gonzales, *Trends in antibiotic utilization in eight Latin American countries, 1997-2007.* Rev Panam Salud Publica, 2010. **27**(3): p. 219-25.
172. Pons, M.J., et al., *Antimicrobial resistance in Shigella spp. causing traveller's diarrhoea (1995-2010): a retrospective analysis.* Travel Med Infect Dis, 2013. **11**(5): p. 315-9.
173. Martinez-Puchol, S., et al., *n vitro development and analysis of Escherichia coli and Shigella flexneri furazolidone-resistant mutants*. 2013, 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Berlin, Germany.
174. Ruiz, J., et al., *In vitro antimicrobial activity of rifaximin against enteropathogens causing traveler's diarrhea.* Diagn Microbiol Infect Dis, 2007. **59**(4): p. 473-5.
175. DuPont, H.L., *Therapy for and prevention of traveler's diarrhea.* Clin Infect Dis, 2007. **45 Suppl 1**: p. S78-84.
176. Pons, M.J., et al., *Fitness and molecular mechanisms of resistance to rifaximin in in vitro selected Escherichia coli mutants.* Microb Drug Resist. **18**(4): p. 376-9.
177. Tupin, A., et al., *Resistance to rifampicin: at the crossroads between ecological, genomic and medical concerns.* Int J Antimicrob Agents, 2010. **35**(6): p. 519-23.
178. Gomes, C., et al., *Relevant role of efflux pumps in high levels of rifaximin resistance in Escherichia coli clinical isolates.* Trans R Soc Trop Med Hyg. **107**(9): p. 545-9.

ANNEX

Contribucions en altres treballs de recerca

... a Manhiça, Moçambique

"Antimicrobial susceptibility and mechanisms of resistance in Shigella and Salmonella isolates from children under five years of age with diarrhea in rural Mozambique"

Mandomando I, Jaintilal D, **Pons MJ**, Vallès X, Espasa M, Mensa L, Sigaúque B, Sanz S, Sacarlal J, Macete E, Abacassamo F, Alonso PL, Ruiz J.

Antimicrob Agents Chemother. 2009 Jun;53(6):2450-4. doi: 10.1128/AAC.01282-08.

"Characterisation Characterisation of extended spectrum β-lactamases among *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteraemia and urinary tract infection in Mozambique"

Pons MJ, Guiral E, Vubil D, Fraile O, Soto SM, Sigaúque B, Alonso PL, Vila J, Mandomando I, Ruiz J

Enviat a publicar

… a Marroc

"Etiology, epidemiology, etiology and clinical characteristics of acute moderate-to-severe diarrhea in children <5 years of age hospitalized in a referral pediatric hospital in Rabat, Morocco"

Ben Messaoud R, Nezha M, Moraleda C, Jroundi I, Tligui H, Seffar M, **Pons MJ**,Chaacho S, Hayes EB, Vila J, Alonso PL, Bassat Q, Ruiz J.

Enviat a publicar

… a Perú

"In vitro development and analysis of Escherichia coli and Shigella boydii azithromycin-resistant mutants"

Gomes C, **Pons MJ**, Magallon-Tejada A, Durand D, Lluque A, Mosquito S, Riveros M, Mercado E, Prada A, Ochoa TJ, Ruiz J.

Microb Drug Resist. 2013 Apr;19(2):88-93. doi: 10.1089/mdr.2012.0036. Epub 2012 Nov 23.

... amb *Bartonella*

"Long time survival of Bartonella bacilliformis in blood stored at 4 °C. A risk for blood transfusions"

Ruiz J, Silva W, **Pons MJ**, Del Valle LJ, Tinco CR, Casabona VD, Gomes C, Bazan J, Zavaleta V, Cornejo H, Champin D, del Valle J.

Blood Transfus. 2012 Oct;10(4):563-4. doi: 10.2450/2012.0152-11. Epub 2012 Mar 29.

"Diagnosis of Carrion's disease by direct blood PCR in thin blood smear negative samples"

del Valle J, Silva W, Tinco C, **Pons MJ**, del Valle LJ, Champin D, Bazán J, , Zavaleta V, Vargas M, RuizJ.

PlosOne

"Development of *16S rRNA* PCR-RFLP assay for Bartonella identification: Potential use to characterize species involved in human infections"

del Valle LJ, Jaramillo M, Talledo M, **Pons MJ**, Flores L, Quispe R, Ramírez P, García de la Guarda R, Alvarado D, Espinoza-Culupú A, del Valle J, Vargas M, Ruíz J

Universal Journal of Microbiology Research (2014). 2: 15-22

… aquí

"β-Lactamases, transferable quinolone resistance determinants, and class 1 integron-mediated antimicrobial resistance in human clinical Salmonella enterica isolates of non-Typhimurium serotypes"Pérez-Moreno MO, Picó-Plana E, de Toro M, Grande-Armas J, Quiles-Fortuny V, **Pons MJ**, Gomes C, Sáenz Y, Torres C, Ruiz J.

Int J Med Microbiol. 2013 Jan;303(1):25-31. doi: 10.1016/j.ijmm.2012.11.003. Epub 2012 Dec 27.

… i al món

"Differences in tetracycline-resistant determinants among *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* are not related to different plasmidi Inc-type carriage"

Pons MJ , Torrents de la Peña A, Mensa L, Marton P, .Ruiz-Roldan L, Martínez-Puchol S, Vila J, Gascón J, Ruiz J.

Antibiotics

AGRAÏMENTS

I fins aquí aquesta etapa.... moltes gràcies a tothom qui ha contribuït en ella. A les personetes que s'han convertit amb la meva família, al laboratori que ha estat com una casa, als avions que s'han tornat imprescindibles, als nous petits espais del món descoberts... i que m'han ensenyat a descobrir la petita científica que hi ha en mi.

Agraeixo al Quim Ruiz, per donar-me la oportunitat de descobrir, per la seva immensa paciència, per ensenyar-me que "sempre hi ha dues maneres de fer les coses". pels concursos de tossuderia. Gràcies per ensenyar-me que "No vulguis beure el vi d'un glop, assaboreix-lo, fes-te amb els aromes, la textura, els gustos. Gaudeix-lo",, perquè malgrat tot ... sempre has fet que gaudis amb el que feia, i no tallar-me mai les ales de la imaginació i la il·lusió... Mil gràcies chefe.

A ell i a l'equip que poc a poc s'ha anat creant... les chipis. A les nenes de màster que s'han fet grans...Lidia i Sandra, amigues, un plaer crèixer amb vosaltres. Noe...per tot el compartit, que a vegades ha estat molt. I la Clàudia, la meva estimada portuguesa, pensar en tu és viure mil històries viatges que em fan somriure: caixes, soques mares, viatges arriscats, integrons, macacos, sube sube baja baja, dedalines, mariposas, bartonellas, pantalones verdes, piernita sola, ...
A totes pels grans "ishhhhh compartits", projectes, il·lusions, reines, plaques, somriures... i xocolata! Valeu molt!

I als que hi heu estat des del principi, he crescut amb vosaltres, sempre hi heu estat, i heu fet que tot això fos molt més divertit. Laura, Alfons, Pau (el meu mestre), Ruth, Diana. I els que ja no hi sou, però heu marcat època: Núria, Cristina, Elisa, Edu, Cèlia. Pel origens del racó 311.

I els "nous" que la familia no para de crèixer: Laura y PANA... això ja ho teniu. Ànim. I tota la resta... llista eterna: les veïnes Nature, gràcies pels bons dies i la paciència. Als

Vivax, als Glico, als nano, als d'immuno, als falciparum, als de Micro (Eli, un inmens plaer haver treballat amb tu). TOOOOOTSSS, ha estat molt bé.

... a Manhiça

Per haver-me sentit viva, per la intensitat del CISM i de Manhiça, per moments ben viscuts, i les grans xerrades. I jugar a ser una "manhiçera"... tot un repte a vegades. A descobrir un trosset d'Àfrica, i els estudis en el seu màxim d'espelndor.

I a totes les grans persones que allí he conegut, i els que encara comprtim, Cristina l' artista, i sobretot a Oscar, el más tozudo, no hay palabras, siempre me quedría corta. BRAVO para Oscar y Mari.

El meu equip favorit, el "tentaçao"... amb qui seguim compartint espais de les nostres vides y espero continui així... Reyes, pel molt compartit... i els que ens queda. Gemma, buffff... ja ho saps oi?

A Lola, a David, el mulungu favorito y Alberto por transmitir su entusiasmo; a la Lusia, por las azañas compartidas, asaltos, ananas, poco tiempo pero mil historias, un tiempo bien vivido, sobretodo por hacerme sonreir tanto. Viva la comfusao.

a Perú...

A todos los miembros del equipo de la Dr. Ochoa, un gusto conocerles y trabajar con ustedes. Mary, un besote gande y especial.

A la Dra, del Valle y su grupo... por las grandes prespectivas.

a Gironella...

A les "nipples", per sempre estar allà i fer-nos costat, i sempre trobar el toc d'humor per posar a la vida i s'han tornat impressindibles. I a les Floretes, després de tants anys i encara hi som! Altarriba, per trobar sempre temps per cuidar a la "mami".

A les nenes Thau, per conservar l'essència tots aquests anys. I intentar entendre que faig i a que em dedico, a vegades tot un repte.

Mar i Julia, les germanes Gilavert, sinònim de dones crítiques, de debats, trobades i xerrades eternes. I si, “no som perfectes, ni deeses, però hi som”. No podem evitar caure, que ens facin mal, equivocar-nos... però hi som! i això és el important.

Al meu tiet, Josep, i la meva cosina, inspiradors de la passió pel coneixement.

I la Vida... tot una dona. Gràcies per ser-hi, fer-me costat i ensenyar-me coses de la vida, per tu una abraçada enorme. I Esteve... per la teva pau, calma i serenitat.

A la mama Rosa, una gran dona, una valenta, que sempre m'ha fet costat, m'ha deixat dedicar-me al que vull, m'ha fet mirar sempre endavant... una gran inspiradora, i que ja té ganes de veure aquesta tesi acabada. Ja està mama!!

Al Carles, segur que ningú no m'ha repetit tants cops la paraula “tesi” com tu. Per aprendre junts a entendre les coses d'una manera alternativa, la nostre manera. Eternament agraïda.

...a tots i cadascú dir-vos que ha estat un immens plaer.