



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Facultat de Biosciències

Departament de Genètica i de Microbiologia

Unitat Docent de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

TESIS DOCTORAL

**Caracterización del entorno genético de genes *bla*_{BLEE} y
plásmidos asociados en cepas circulantes de *Escherichia coli* y
Klebsiella pneumoniae en España.**

Karol Diestra Villanueva

Director:

Ferran Navarro Risueño

2010

Barcelona 15 de Junio de 2010.

El Dr. Ferran Navarro Risueño profesor asociado médico del Departamento de Genética y de Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe Clínico del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Certifica que:

La presente tesis titulada “Caracterización del entorno genético de genes *bla*_{BLEE} y plásmidos asociados en cepas circulantes de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en España” presentada por Karol Diestra Villanueva para optar al grado académico de Doctora en Ciencias Biológicas, ha sido elaborada bajo mi dirección y cumple los requisitos necesarios para su tramitación y posterior defensa delante del tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmo este documento a los efectos oportunos.

Ferran Navarro
Servei de Microbiologia
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
Sant Antoni M^a Claret, 167
08025 Barcelona

*A mis padres y hermanos,
sin ustedes no sería quien soy*

*A mi hijo Eric
la razón de mi vida*

*A Nino, mi
amor incondicional*

*A Carmen,
allá donde esté.*

AGRADECIMIENTOS

“La vida es corta, la gratitud eterna”

Anónimo

“Cuando quieres realmente una cosa, todo el Universo conspira para ayudarte a conseguirla”

Paulo Coelho

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Pere Coll, por abrirme las puertas de la Universitat Autònoma de Barcelona al aceptarme como alumna de doctorado. Por su cordialidad y apoyo, por haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo.

Al Dr. Ferran Navarro, director de esta tesis, por ser quien me introdujo en el mundo de las betalactamasas, por haber mostrado siempre generosidad e interés, por su disponibilidad, amabilidad y paciencia.

A la Dra. Eli Miró por su disposición permanente e incondicional, por su orientación, sugerencias y estímulos brindados en todo momento, tanto en lo profesional como en lo personal.

A la Dra. Beatriz Mirelis por sus valiosas aportaciones para mejorar la redacción de este documento.

Al Dr. Marek Gniadkowski, por haberme recibido en su laboratorio en Varsovia, porque siempre será para mí una referencia tanto por su profesionalidad como por su grandeza humana.

A los doctores Rafael Cantón, José Campos, Jesús Oteo, Antonio Oliver, Teresa M. Coque, Carlos Juan Nicolau, Bartolomé Moyá, María Pérez-Vázquez, Tania Curiao, V. Bautista; así como también a los grupos de investigación de los centros que participaron en la ejecución de este proyecto, por sus aportaciones científicas y arduo trabajo en equipo.

A Carolyn Newey, por su disponibilidad, ayuda y buen ánimo al momento de corregir el inglés de los documentos.

Al Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu, por el apoyo económico brindado.

En el plano personal el primer agradecimiento va por supuesto para mi familia. A mis padres, a quienes les debo todo, en especial a mi madre. Gracias por inyectarme tu fuerza y tu valor, gracias por haber sacado fuerzas de donde no había para lograr salir adelante, porque no hay mujer más luchadora en esta vida que tú. A mi padre, por tantos consejos, por aquellas charlas largas de experiencia de vida, gracias por brindarme tu amor, optimismo y comprensión.

A mis maravillosos hermanos: Eli, por ser explosión de sentimientos, por siempre encontrar ideas de solución a los inconvenientes, por estar siempre allí, a mi lado; gracias por tanta preocupación “sis”. César, por su gran paciencia, por escucharme, soportarme y aconsejarme siempre; porque sin tu apoyo me hubiera encontrado un poco perdida, porque fuiste, eres y seguirás siendo mi ángel de la guarda. A Mariana, que aunque hayamos compartido muy pocos momentos, estos han sido muy intensos; gracias por esa inyección de dinamismo y jovialidad.

A Geoffrey, Franklin, Christian, Zully, Paola, José, Gyselle y Liz; por ser unos amigos increíbles, por haber enriquecido mi vida con su cariño y alegría. Gracias por recordarme que hay personas valiosas en el mundo y gracias por estar en el mío.

A Laura, Montse, Oscar E., Cate, Michel, Oscar C. y Manel; por su apoyo, colaboración, ánimo y cariño; por compartir conmigo muchos momentos tanto alegres como no tan alegres, por esas tardes de té, por tener siempre tendida su mano amiga,

por escucharme, por haberme hecho sentir en todo momento en casa. En fin, por ser personajes que han dejado huella en mi vida.

A las chicas de Serología: Gloria, Julia y Mercé, por su cariño y por mostrar preocupación e interés por mí.

A Sofía, por su generosidad, apoyo y ayuda incondicional, gracias por estar siempre aconsejándome y no dejarme caer en el desánimo.

A Janusz, Radek, Anna y Ewa; por hacer más cálido el invierno de Polonia, por su buen humor y empeño a la hora de trabajar y por sus intentos fallidos al enseñarme polaco, dziękuję!

A Marija, por ser mi familia durante esos tres meses lejos de casa, por su simpatía, por su gran sentido del humor y esas largas caminatas a lo largo de toda Varsovia.

Y por último, a los pilares de mi vida: A Nino, por su comprensión, bondad y amor incondicional, por sus consejos (sobretudo en la parte informática), por su generosidad, paciencia y por estar siempre a mi lado; y a mi niño, mi Eric, la luz de mis ojos, gracias por tanta paciencia hijo... Gracias por hacer de mi vida la más feliz de las existencias!

ÍNDICE

RESUMEN/SUMMARY	1
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Las enterobacterias	12
1.2. Antibióticos Betalactámicos	15
1.2.1. Clasificación	15
a. Penicilinas	17
b. Cefalosporinas	17
c. Carbapenémicos	18
d. Monobactámicos	19
e. Inhibidores de betalactamasas	20
1.2.2. Mecanismo de acción	21
1.2.3. Espectro de actividad	23
1.3. Resistencia antimicrobiana	26
1.3.1. Resistencia natural	26
1.3.2. Resistencia adquirida	26
a. Transformación	26
b. Transducción	26
c. Conjugación	27
1.3.3. Elementos móviles de material genético	27
a. Secuencias de inserción	27
b. Transposones	28
c. Integrones	28
d. Plásmidos	29
– Clasificación de los plásmidos	29
– Relaxasas	30
– Incompatibilidad plasmídica y plásmidos en Enterobacterias	31
1.3.4. Mecanismos de resistencia a los betalactámicos	32
a. Alteración de la diana	32
b. Alteración de la membrana externa	32
c. Sistema de expulsión activa	32
d. Producción de enzimas que inactivan al antimicrobiano	33
1.4. Las betalactamasas	33
1.4.1. Mecanismo de acción	33
1.4.2. Clasificación	34
a. Betalactamasas del grupo 1	36
b. Betalactamasas del grupo 2	36
c. Betalactamasas del grupo 3	38
d. Betalactamasas del grupo 4	38
1.4.3. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)	39

a.	TEM	41
b.	SHV	41
c.	CTX-M	42
d.	OXA	42
e.	Otras BLEE	43
1.4.4.	Detección de BLEE	44
a.	Método de disco difusión	45
b.	Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)	46
c.	Otras pruebas	47
d.	Sistemas automatizados	48
e.	Métodos moleculares	49
1.5	Antecedentes históricos y contextualización de la presente tesis doctoral	50
2.	OBJETIVOS	53
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
3.1.	Caracterización y epidemiología de las BLEE (Artículo I)	59
3.1.1.	Selección de las cepas	59
3.1.2.	Relación clonal de las cepas	61
3.1.3.	Caracterización de BLEE	65
3.2.	Caracterización de los plásmidos portadores de genes <i>bla</i> _{BLEE} y su correspondiente entorno genético (Artículo II)	75
3.2.1.	Enzimas del grupo CTX-M-9	79
3.2.2.	Enzimas del grupo CTX-M-14	80
3.2.3.	Enzimas del grupo CTX-M-1	81
3.2.4.	Enzimas del grupo SHV	85
3.3.	Estructura Poblacional de cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE (Artículo III)	88
4.	CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	91
5.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	97
6.	ANEXOS	117
6.1.1.	Caracterización y epidemiología molecular de betalactamasas de espectro extendido en <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> en once hospitales españoles (2004). Diestra, K., M. Coque, E. Miró, J. Oteo, C. Juan, T. Curiao, B. Moyá, J. Campos, R. Cantón, A. Oliver and F. Navarro. <i>Enferm Infecc Microbiol Clin.</i> 2008; 26: 404-10	119
6.1.2.	Characterization of plasmids encoding <i>bla</i> _{ESBL} and surrounding genes in Spanish clinical isolates of <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Diestra, K., C. Juan, T. Curiao, B. Moyá, E. Miró, J. Oteo, M. Coque, M. Pérez-Vásquez, J. Campos, R. Cantón, A. Oliver and F. Navarro. <i>J Antimicrob Chemother.</i> 2009; 63: 60-6.	129
6.1.3.	Extended-spectrum betalactamase-producing <i>Escherichia coli</i> in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. Oteo, J., K. Diestra, C. Juan, V. Bautista, A. Novais, M. Pérez-Vásquez, B. Moyá, E. Miró, M. Coque, A. Oliver, R. Cantón, F. Navarro, J. Campos, Spanish Network in Infectious Pathology Project (REIPI). <i>Int J Antimicrob Agents.</i> 2009; 34: 173-76.	136

RESUMEN

RESUMEN

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) descritas frecuentemente en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y en menor medida en otras enterobacterias, confieren resistencia a cefalosporinas de espectro extendido (cefotaxima, ceftazidima y cefepima) y monobactámicos, y constituyen un grupo heterogéneo de enzimas. En un inicio, la descripción de BLEE abarcaba en su mayoría brotes hospitalarios que frecuentemente implicaban *K. pneumoniae* y BLEE derivadas de SHV-1 o de TEM-1. En los últimos años se ha detectado el incremento de las BLEE de tipo CTX-M. Su difusión en bacterias de la misma o de diferente especie se ha asociado a ciertos elementos genéticos como las secuencias de inserción, los transposones y los plásmidos. Aunque con menor frecuencia, también se ha descrito la dispersión clonal de cepas productoras de este tipo de BLEE como por ejemplo las cepas productoras de CTX-M-15.

El incremento en la prevalencia de microorganismos con BLEE ha sido descrito por diferentes autores, tanto en el ámbito nacional como internacional. El Sistema Europeo de Vigilancia de Resistencias a Antimicrobianos en patógenos invasores (EARSS) observó que la resistencia a cefalosporinas de tercera generación asociada a la producción de BLEE en *E. coli* aumentó en casi todos los países europeos incluidos en el estudio; concretamente en España aumentó del 1,6% al 4,1% en el periodo 2001-2003. Además, un estudio multicéntrico realizado en España durante el año 2000 (proyecto GEIH-BLEE 2000) para determinar la prevalencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* portadores de BLEE en 40 hospitales españoles, constató que en *E. coli* las BLEE CTX-M-9, CTX-M-14 y SHV-12 constituían el 70% de las enzimas detectadas, en cambio, en *K. pneumoniae* más del 50% fueron del tipo TEM.

En los últimos años, son muchos los hospitales españoles que han observado un cambio en la prevalencia de las diferentes enzimas detectadas en *E. coli* y *K. pneumoniae*. Es por esto que en la “Red Española para la Investigación en Patología Infecciosa” (REIPI) se planteó la necesidad de realizar un estudio multicéntrico que ha permitido conocer y actualizar la evolución y el tipo de BLEE en *E. coli* y *K. pneumoniae* en diferentes hospitales de España y descartar, mediante estudios moleculares, la posible expansión clonal de los microorganismos portadores de estas betalactamasas.

Así, el presente trabajo formó parte del proyecto N° 3 (Estudio de la epidemiología clínica y molecular de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido) de la REIPI, en el cual participaron cuatro centros: el Hospital Ramón y Cajal (HRC), el Hospital Universitario Son Dureta (SD), el Centro Nacional de Microbiología (CNM) y el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSP). Se estudiaron un total de 92 cepas de *E. coli* y 32 de *K. pneumoniae* aisladas en el primer trimestre del año 2004 en 11 hospitales españoles. La relación clonal entre las cepas se descartó mediante estudios de macrorestricción genómica con la enzima de baja frecuencia de corte *Xba*I. Las BLEE se caracterizaron mediante isoelectroenfoque, PCR y secuenciación. En las cepas de *E. coli* se observó una gran diversidad clonal en los patrones de restricción obtenidos por PFGE, y un predominio de las betalactamasas CTX-M-14 (45,7%), CTX-M-9 (20,6%) y SHV-12 (21,7%); en cambio, en las cepas de *K. pneumoniae* se observó una menor diversidad clonal con un predominio de betalactamasas de tipo CTX-M (62,5%) que incluían CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-14 y CTX-M-15. **(ARTÍCULO I)**

Posteriormente se estudiaron los entornos genéticos y perfiles plasmídicos de 58 cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* y se determinó el grupo de incompatibilidad de los plásmidos mediante rep *typing*-PCR, digestión con la enzima *S1*, campo pulsado, *southern-blot* e hibridación con sondas específicas para los diferentes grupos de incompatibilidad. Como resultado se observó una gran variabilidad de plásmidos que contienen genes *bla*_{BLEE} asociados a diferentes entornos genéticos. Los genes *bla* asociados a una mayor variabilidad plasmídica fueron los *bla*_{CTX-M-9}, encontrándose asociados a plásmidos de los grupos Inc I1, HI2, FIB y K. Los genes de la *bla*_{SHV-12} se han encontrado en plásmidos de los grupos Inc I1, FII, K y HI2. Por otro lado, *bla*_{CTX-M-14} se encontró sólo en plásmidos del grupo Inc K. **(ARTÍCULO II)**

Finalmente, el Centro Nacional de Microbiología procedió a realizar el estudio epidemiológico mediante *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) y la determinación de los grupos filogenéticos de las cepas de *E. coli*, con la finalidad de determinar la posible asociación entre los diferentes ST, grupos filogenéticos y BLEE. Así, se observó una gran diversidad de tipos de ST, siendo los más comunes el patrón ST131 y los complejos ST10 y ST23, y además, las cepas de *E. coli* que pertenecían al ST131 fueron portadoras de una gran variedad de betalactamasas (CTX-M-15, CTX-M-9, CTX-M-10, CTX-M-14, SHV-12

y CTX-M-1). Por lo que respecta a los grupos filogenéticos, se encontró que los complejos ST10 y ST23 estaban ligados al grupo filogenético A, mientras que el patrón ST131 en su mayoría estaba ligado al grupo virulento extraintestinal B2. **(ARTÍCULO III)**

Por lo tanto, en este estudio se observó una mayor diversidad de BLEE que en el estudio multicéntrico del año 2000, siendo estas BLEE vehiculadas por elementos genéticos como plásmidos y secuencias de inserción, ambos muy diversos dentro del grupo de cepas estudiadas. Por otro lado no se observó asociación entre los diferentes tipos de MLST, los grupos filogenéticos hallados y las BLEE que portaban las cepas de *E. coli*.

SUMMARY

Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), described frequently in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and to a lesser extent in other *Enterobacteriaceae*, confer resistance to extended-spectrum cephalosporins (cefotaxime, ceftazidime, and cefepime) and monobactams. ESBL are a heterogeneous group of enzymes that were initially described in hospital outbreaks of *K. pneumoniae*, and derivatives of the SHV-1 and TEM-1 were the most common. In recent years, detection of the CTX-M type has become more frequent. The spread of ESBL in bacteria of the same or different species has been associated with genetic elements such as insertion sequences, transposons and plasmids.

The increase in the prevalence of ESBL-producing microorganisms has been reported by several authors, both in Spain and internationally. The European System of Surveillance of Antimicrobial Resistance in Invasive Pathogens (EARSS) observed that resistance to third generation cephalosporins associated with ESBL production in *E. coli* increased in almost all European countries included in the study. In Spain it increased from 1.6% in 2001 to 4.1% in 2003. In 2000, a multicenter study was conducted in Spain (project GEIH-BLEE 2000) to determine the prevalence of ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* in 40 Spanish hospitals. It was found that the CTX-M-9, CTX-M-14 and SHV-12 in *E. coli* accounted for 70% of the enzymes detected. However, in *K. pneumoniae*, over 50% were TEM type

Over the last 10 years, many hospitals in Spain have seen a change in the prevalence of enzymes detected in *E. coli* and *K. pneumoniae*. For this reason, the Spanish Network for Research on Infectious Pathology (REIPI) recognized the need for a multicenter study. Based on the findings, it was possible to identify and update the progress and the type of ESBL in *E. coli* and *K. pneumoniae* in several Spanish hospitals. Furthermore, molecular studies ruled out the possible clonal spread of ESBL-producing microorganisms.

The present study was conducted as Project No. 3 (Clinical epidemiology and molecular characterization of ESBL-producing enterobacteria) of the REIPI. It involved four centers: Hospital Ramon y Cajal (HRC), Hospital Universitario Son Dureta (SD), National Center for Microbiology (CNM) and Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSP). A total of 92 strains of *E. coli* and 32 *K. pneumoniae* isolated from 11 Spanish hospitals in 2004 were

analyzed. The clonal relationship between strains was ruled out by genomic studies comparing the *Xba*I-PFGE patterns. The ESBL were characterized by isoelectric focusing, PCR and sequencing. *E. coli* showed a high clonal diversity in the restriction patterns obtained by PFGE, and a predominance of the enzymes CTX-M-14 (45.7%), CTX-M-9 (20.6%) and SHV-12 (21.7%), whereas *K. pneumoniae* had a lower clonal diversity with a predominance of the enzymes CTX-M type (62.5%) involving CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-14 and CTX-M-15. **(ARTICLE I)**

We then studied the genetic environments and plasmid profiles of 58 strains of *E. coli* and *K. pneumoniae* and determined the incompatibility group of plasmids by rep typing, S1 enzyme digestion, pulsed field gel electrophoresis, southern-blot and hybridization with specific probes for each incompatibility group. As a result there was a large variability of plasmids containing *bla*_{ESBL} genes associated with different genetic environments. The gene with the greatest plasmid variability was *bla*_{CTX-M-9}, associated to Inc groups I1, HI2, FIB and K. The *bla*_{SHV-12} gene was found in plasmids of groups Inc I1, FII, K and HI2. However, *bla*_{CTX-M-14} was found only on IncK plasmids **(ARTICLE II)**.

In a third phase of the study, the National Microbiology Center in Spain performed the Multi Locus Sequence Typing (MLST) and determined the phylogenetic groups of strains of *E. coli* to determine the possible association between ST, phylogenetic groups and ESBL. A wide variety of MLST were detected, and the most common patterns were ST131 and ST10 and ST23 complexes. In addition, strains of *E. coli* ST131 carried a variety of betalactamase (CTX-M-15, CTX-M-9, CTX-M-10, CTX-M-14, SHV-12 and CTX-M-1). Regarding the phylogenetic groups, we found that ST10 and ST23 complexes were linked to phylogenetic group A, whereas the pattern ST131 was related to the virulent extraintestinal group B2. **(ARTICLE III)**

In conclusion, this study identified a greater variety of ESBL than observed in the multicenter study of 2000. These ESBL were transported by genetic elements such as plasmids and insertion sequences which were very diverse within the group of strains studied. We did not detect an association between the different types of MLST, the filogenetic groups and the ESBL-producing *E. coli*.

1. INTRODUCCIÓN

*“Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza.
Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un
niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”*

Marja Skłodowska-Curie

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos, uno de los principales problemas de salud pública, es una grave amenaza que día a día involucra nuevas especies de microorganismos y nuevos mecanismos de resistencia. La resistencia bacteriana es un fenómeno ligado al uso de antibióticos, pero a la vez, la capacidad de las bacterias para combatir el efecto que en ellas producen estas sustancias ha superado todas las previsiones. Este hecho nos indica que además de fomentar un uso racional de los antibióticos, las líneas de trabajo deben estar orientadas hacia la búsqueda de nuevos fármacos que o bien eludan los mecanismos de resistencia de los microorganismos o bien actúen sobre dianas biológicas hasta ahora inéditas.

Los antibióticos betalactámicos configuran el grupo de antimicrobianos más extenso de cuantos integran hoy el arsenal terapéutico frente a la infección bacteriana. Las betalactamasas, enzimas que hidrolizando el enlace amida del anillo betalactámico inactivan los antibióticos betalactámicos, constituyen el mecanismo de resistencia más difundido entre la población bacteriana, y el que, sin duda, más ha hecho progresar la antibioterapia. La interrelación betalactámicos-betalactamasas es el substrato de una “historia interminable” de la que hoy sólo conocemos algunos capítulos.

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), descritas frecuentemente en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y en menor medida en otras enterobacterias, confieren resistencia a cefalosporinas de espectro extendido y constituyen un grupo heterogéneo de enzimas^{12, 14, 15, 109}. Las infecciones en las que están implicadas representan un reto debido a que con frecuencia los microorganismos que las producen son también resistentes a otros

antimicrobianos como trimetoprim-sulfametoxazol, aminoglucósidos y fluoroquinolonas, limitando las opciones terapéuticas^{109, 120}.

La inactivación enzimática, y en concreto las betalactamasas, constituyen el mayor éxito estratégico de los microorganismos en su esfuerzo por contrarrestar el efecto de los antibióticos betalactámicos desarrollados por el hombre. La diseminación de los genes productores de betalactamasas, frecuentemente asociados a transposones y plásmidos transmisibles entre distintos microorganismos, ha dado lugar a una alta prevalencia de la resistencia a los betalactámicos.

1.1 Las enterobacterias

La familia *Enterobacteriaceae*, grupo grande y heterogéneo de bacilos gramnegativos de importancia clínica, contiene más de 40 géneros y diversos grupos no nominados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>).

Los miembros de esta familia son aerobios y anaerobios facultativos, no forman esporas, son móviles con flagelos peritricos o inmóviles. Tienen requerimientos nutricionales simples, fermentan la glucosa con o sin producción de gas, reducen los nitratos a nitritos, son oxidasa negativa (característica importante que permite distinguirlos de otros bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores) y catalasa positiva¹¹⁷.

La pared celular de las enterobacterias (Figura 1) está compuesta por mureína, lipoproteínas, fosfolípidos, proteínas y lipopolisacáridos (LPS) y tiene una disposición laminar. La capa de lipoproteína-mureína constituye alrededor del 20% de la pared de la célula y es responsable de la rigidez celular. El 80% restante de la pared celular se une con los lípidos de la lipoproteína para formar la capa laminar. El LPS contiene las cadenas

polisacáridas específicas que determinan la antigenicidad de las diversas especies (el tipo O) y su componente lipídico es la estructura responsable de la actividad endotóxica.

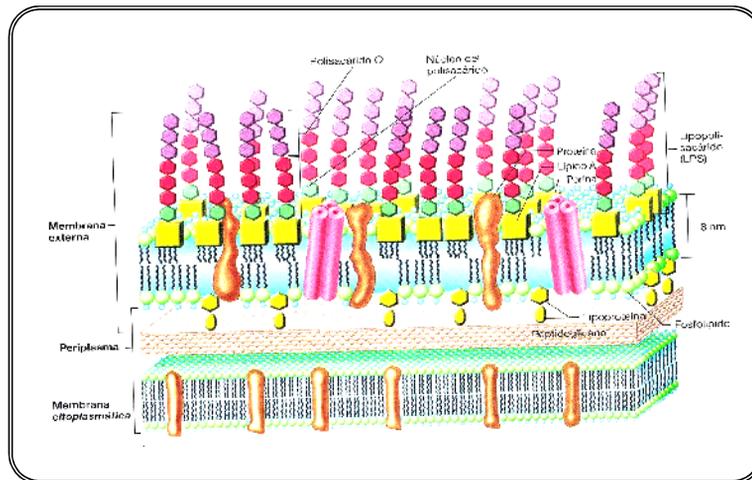


Figura 1: Pared celular de las enterobacterias

La identificación y/o tipificación de las enterobacterias se realiza en función de sus características bioquímicas y en función de los antígenos O (antígeno somático), H (antígeno flagelar) y K (antígeno capsular).

Los miembros de esta familia forman parte de la microbiota del tracto intestinal del ser humano y de los animales; también algunas especies pueden colonizar otros nichos ecológicos como el agua, el suelo o ser parásitos de vegetales⁸¹. Con excepción de los géneros *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*, las enterobacterias son parte de la flora normal o son bacterias ambientales, pudiendo dar lugar a infecciones oportunistas cuando existen factores predisponentes.

En lo que respecta al hombre, existen especies patógenas primarias, como *Salmonella enterica* (cuyos serotipos gastroenteríticos causan enteritis y los serotipos Typhi y Paratyphi A, B y

C fiebre tifoidea y paratifoidea), las cuatro especies del género *Shigella* (causantes de enteritis), algunas especies del género *Yersinia*, como *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* (causantes de enteritis) y *Y. pestis* (agente causal de la peste) y algunas cepas de *Escherichia coli* que causan gastroenteritis por diferentes mecanismos. Se han descrito diversos mecanismos patogénicos, dividiéndose en seis grupos dependiendo de los factores de virulencia *E. coli* enteroinvasora (ECEI), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteropatógena clásica (ECEPc), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enteroagregativa (ECEA) y *E. coli* con adherencia difusa (ECAD).

Las especies de esta familia que causan infecciones oportunistas en el hombre con más frecuencia son *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia stuartii*, y *Morganella morganii* entre otras¹¹⁷.

E. coli forma parte de la flora normal humana, es el principal habitante anaerobio facultativo del intestino grueso, con posible capacidad patógena debido a la posesión de factores de virulencia como fimbrias, adhesinas, toxinas, etc. Es causante de muchas infecciones tales como colecistitis, bacteriemia, colangitis, infección del tracto urinario (ITU), y otras infecciones tales como meningitis neonatal y neumonía. *K. pneumoniae* se encuentra colonizando el intestino de los individuos sanos y produce un perfil de infección similar al de *E. coli*, es decir, infección del tracto urinario, neumonía, infección de herida quirúrgica y bacteriemia. *K. pneumoniae* puede ocasionar infecciones en aproximadamente el 3% de todas las neumonías bacterianas agudas y es el segundo patógeno más común del tracto urinario. También pueden causar infecciones de heridas y es la segunda especie en frecuencia (después de *E. coli*) causante de bacteremia por gramnegativos⁹⁶.

1.2 Antibióticos Betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos se han usado ampliamente en el tratamiento de numerosas infecciones bacterianas. El creciente e inadecuado uso de estos antibióticos, entre otros factores, ha provocado una paulatina pérdida de la eficacia de los mismos en el tratamiento de este tipo de infecciones. El factor que más ha contribuido a este hecho es la aparición y diseminación de betalactamasas.

1.2.1 Clasificación

La presencia de un anillo betalactámico define químicamente a esta familia de antibióticos^{55, 83}. Las diferencias en las cadenas laterales de las moléculas básicas influyen en las propiedades farmacológicas y en el espectro de actividad⁵⁴. Así, la unión del anillo betalactámico a uno secundario, origina los diferentes grupos descritos dentro de la familia.

Los betalactámicos se clasifican en: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos e inhibidores de las betalactamasas. (Tabla 1)

Tabla 1: Principales antibióticos betalactámicos (iv: intravenoso, im: intramuscular, o: oral)

Clase	Grupo	Betalactámico
Penicilinas	Penicilinas naturales	Penicilina G ^{im,iv} , Penicilina V ^o
	Aminopenicilinas	Ampicilina ^{iv} , Amoxicilina ^o
	Ureidopenicilinas	Azlocilina ^{im,iv} , Mezlocilina ^{im,iv} , Piperacilina ^{iv}
	Carboxipenicilinas	Carbencilina ^{im,iv} , Ticarcilina ^{im,iv}
	Penicilinas resistentes a penicilinasas	Meticilina ^{im,iv} , Oxacilina ^{iv,o} , Cloxacilina ^o , Dicloxacilina ^o
Cefalosporinas	Cefalosporinas 1G	Cefazolina ^{im,iv} , Cefalotina ^{iv} , Cefradina ^{im,iv,o} , Cefalexina ^o , Cefradoxilo ^o
	Cefalosporinas 2 ^a G	Cefamandol ^{im,iv} , Cefuroxima ^{im,iv} , Cefaclor ^o , Cefuroxima axetilo ^o
	Cefalosporinas 3 ^a G	Cefoperazona ^{im,iv} , Cefotaxima ^{im,iv} , Ceftazidima ^{im,iv} , Ceftriaxona ^{im,iv} , Ceftributeno ^o , Cefixima ^o , Cefpodoxima ^o , Cefdinir ^o
	Cefalosporinas 4 ^a G	Cefepima ^{im,iv} , Cefpiroma ^{im,iv}
	Cefamicinas	Cefoxitina ^{im,iv} , Cefotetan ^{im,iv}
	Oxacefems	Moxalactam ^{im,iv}
	Carbacefems	Loracarbef ^o
	Carbapenémicos	Imipenem ^{iv} , Meropenem ^{iv} , Ertapenem ^{iv} , Doripenem ^{iv}
Monobactámicos	Aztreonam ^{im,iv}	
Inhibidores de betalactamasas	Ácido clavulánico	Amoxicilina –ác. clavulánico ^{iv,o} Ticarcilina–ac. clavulánico ^{iv} ,
	Sulbactam	Ampicilina-sulbactam ^{iv,o}
	Tazobactam	Piperacilina-tazobactam ^{iv}

a. Penicilinas

Las penicilinas son un grupo de antibióticos que contienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar al doble anillo característico (Figura 2). Además tienen una cadena lateral, que varía de unas penicilinas a otras en la posición 6 del anillo betalactámico y que es la que define sus propiedades.

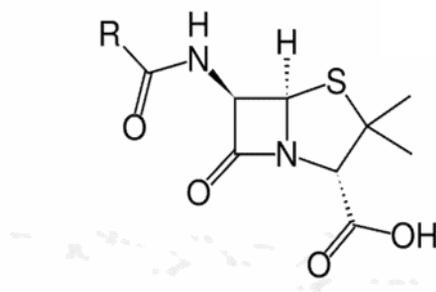


Figura 2. Núcleo de las penicilinas (en rojo se observa el anillo β -lactámico)

b. Cefalosporinas

Las cefalosporinas son fármacos estructuralmente similares a las penicilinas, cuya estructura básica está constituida por el núcleo cefem, que consiste en la fusión de un anillo dihidrotiacínico (en lugar del anillo tiazolidínico característico de las penicilinas) y un anillo betalactámico (Figura 3). La introducción de modificaciones en las cadenas laterales origina las diversas cefalosporinas.

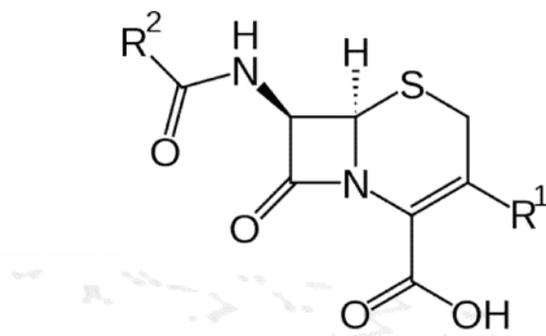


Figura 3. Núcleo de las cefalosporinas

Las cefalosporinas se clasifican clásicamente en "generaciones", en base al espectro de actividad para gérmenes grampositivos y gramnegativos. Además, se incluyen otros grupos de compuestos químicamente diferentes como las cefamicinas, los carbacefems y los oxacefems.

c. Carbapenémicos

La estructura básica de los carbapenémicos consiste en un anillo betalactámico fusionado a uno pirrolidínico compartiendo un nitrógeno (Figura 4). Estas modificaciones y las cadenas laterales, así como la posición espacial de éstas, condicionan la mayor afinidad por las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) diana, un incremento de la potencia, del espectro antibacteriano y de la resistencia a las betalactamasas, siendo los betalactámicos de más amplio espectro y actividad.

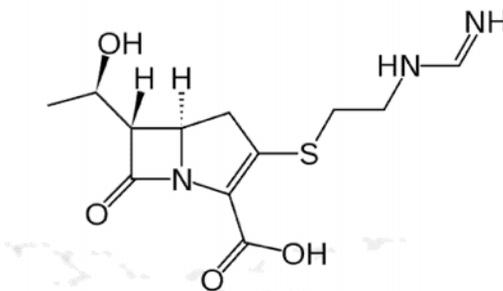


Figura 4. Estructura del imipenem

d. Monobactámicos

Los monobactámicos son derivados del ácido 3-aminomonobactámico (3-AMA). Tienen una estructura betalactámica sencilla con una estructura monocíclica en la que el anillo betalactámico no está fusionado a otro secundario (Figura 5).

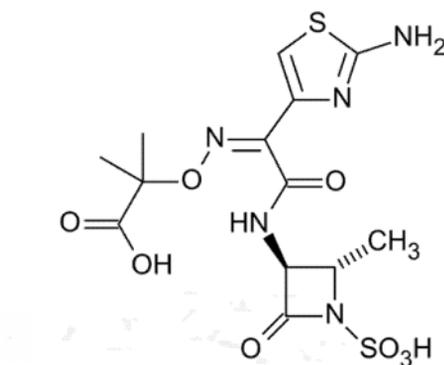
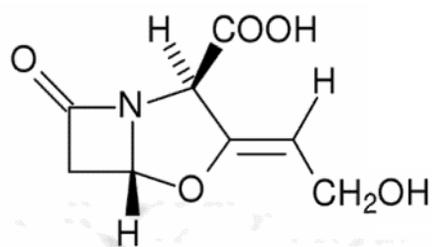


Figura 5. Estructura del aztreonam

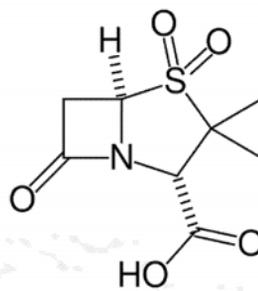
e. Inhibidores de betalactamasas

A este grupo pertenecen el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam, enzimas que inactivan a los antibióticos betalactámicos. Se fijan a las betalactamasas dejándose hidrolizar por ellas y permite así que éstas no interfieran en la acción de los betalactámicos con los que se combinan.

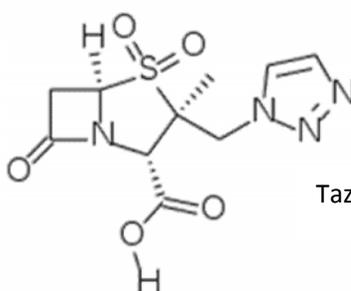
El **ácido clavulánico** tiene un núcleo similar al ácido penicilánico de las penicilinas con la sustitución del átomo de azufre en posición 3 por un átomo de oxígeno (que incrementa la reactividad de la molécula y proporciona una afinidad mayor por las betalactamasas), y la falta de la cadena lateral acilamino en posición 6. El **sulbactam** es una sulfona semisintética del ácido penicilánico. El **tazobactam** se diferencia del sulbactam por la presencia de un grupo triazol en posición 3 (Figura 6).



Ácido clavulánico



Sulbactam



Tazobactam

Figura 6. Estructura de los inhibidores de betalactamasas

1.2.2 Mecanismo de acción

Los antibióticos betalactámicos son agentes bactericidas que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana e inducen además un efecto autolítico.

La pared de las bacterias gramnegativas consta de una membrana externa formada por lípidos y proteínas y de una delgada capa interna de péptidoglucano. El péptidoglucano está constituido por cadenas largas y paralelas de oligosacáridos que alternan residuos de ácido N-acetilglucosamina con residuos de ácido N-acetilmurámico, ambos unidos por un enlace β -1,4. Cada unidad de ácido N-acetilmurámico se encuentra unida a una cadena lateral un tetrapéptido constituido por L-alanina, D-alanina, ácido D-glutámico y lisina o ácido diaminopimélico (Figura 7). Las cadenas paralelas de oligosacáridos se encuentran unidas transversalmente por cadenas polipeptídicas cortas diferentes según la especie ^{79, 129}.

Los antibióticos betalactámicos actúan interfiriendo en las reacciones de transpeptidación, última etapa de la síntesis de la pared celular; de este modo, la pared queda debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular. Su actividad probablemente se debe a una similitud estereoquímica con la terminación D-analil-D-analina del pentapéptido y eso permite una unión covalente en el lugar activo de la transpeptidasa. La destrucción de la pared celular bacteriana se produce como consecuencia de la inhibición de la última etapa de la síntesis del péptidoglucano. Para que actúen los betalactámicos es necesario que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que es cuando se sintetiza la pared celular.

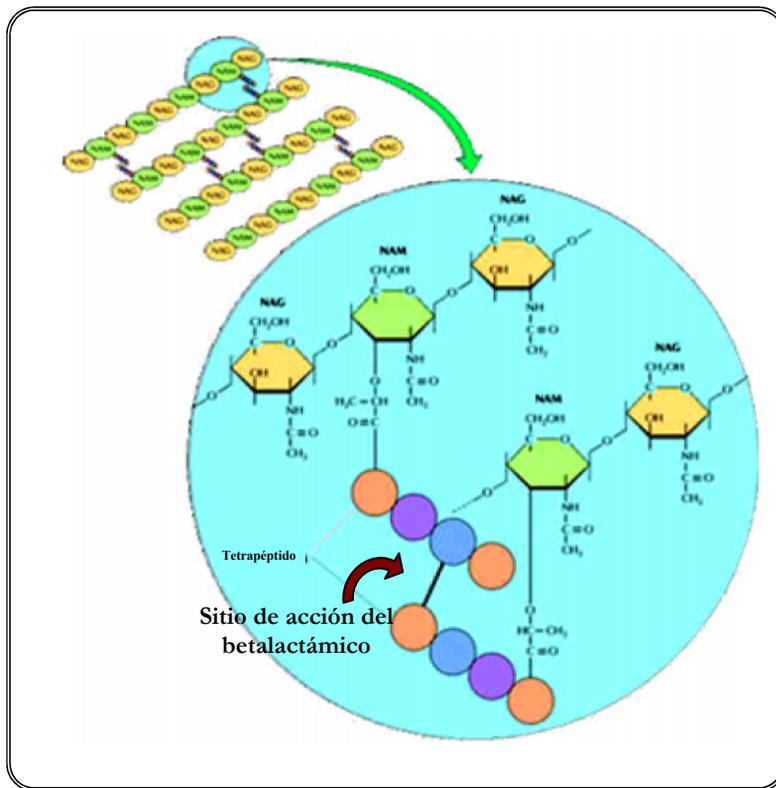


Figura 7. Estructura del péptidoglucano y sitio de acción del betalactámico

Las enzimas dianas de betalactámicos se hallan en la membrana citoplasmática. Son las denominadas proteínas fijadoras de la penicilina (PBP) debido a que se describieron por primera vez unidas a penicilina. Existen numerosas PBP diferentes, siendo habitualmente específicas de especie y varían en cuanto a su capacidad de reaccionar con diferentes antimicrobianos betalactámicos. También existen diferencias funcionales entre las PBP: algunas son responsables de establecer los enlaces de peptidoglicanos que proporcionan al microorganismo su forma; otras participan en la síntesis de los tabiques que separan las células nuevamente formadas; otras no son necesariamente enzimas, y su función es todavía desconocida.

Un betalactámico que sea principalmente activo sobre una PBP determinante de la morfología celular dará lugar a un redondeamiento e hinchamiento de un

microorganismo sensible ante de que ocurra la lisis. Uno que actúe fundamentalmente sobre la separación y la división celular puede originar células alargadas con múltiples nucleoides.

La acción bactericida de los antibióticos betalactámicos se debe habitualmente a la lisis celular, proceso que se inicia con el debilitamiento del péptidoglucano en desarrollo, la liberación o activación de las enzimas autolíticas que más adelante romperán las áreas debilitadas de la pared y, finalmente, la lisis osmótica al permitir el paso de agua a través de la membrana citoplasmática hacia el interior hipertónico de la célula¹²⁹. Aquellos microorganismos que no poseen pared celular, las células que no están en desarrollo y los protoplastos osmóticamente estabilizados, permanecen viables en presencia del antimicrobiano⁹¹.

1.2.3. Espectro de actividad

El espectro de actividad de los betalactámicos incluye bacterias gramnegativas, grampositivas y espiroquetas. No son activos frente a bacterias intracelulares como *Chlamydia* o *Rickettsia*, los micoplasmas (por no tener pared celular) o las micobacterias^{83, 142}.

Las **penicilinas** naturales (bencilpenicilina o penicilina G) son activas frente a cocos grampositivos y gramnegativos y bacilos grampositivos, tanto facultativos como anaerobios, así como espiroquetas y algunos bacilos gramnegativos anaerobios. Las **aminopenicilinas** son activas frente a la mayoría de las bacterias sensibles a penicilina e incrementan el espectro a algunos bacilos gramnegativos como *E. coli*, *P. mirabilis*,

Salmonella y *Shigella*. Son más activas que las penicilinas frente a los enterococos, *Listeria monocytogenes* y *Haemophilus*.

Las **carboxipenicilinas** y **ureidopenicilinas** se caracterizan por su actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa* y algunas enterobacterias resistentes a aminopenicilinas.

Las penicilinas semisintéticas resistentes a penicilinasas son activas frente a los estafilococos.

Las **cefalosporinas de primera generación** son muy activas frente a los cocos grampositivos y diversos bacilos gramnegativos como *E. coli*, *Klebsiella* y *Protens*. Las sucesivas generaciones han perdido parte de esta actividad, en beneficio de una mayor actividad frente a bacilos gramnegativos. Las **cefalosporinas de segunda generación** muestran un espectro variable. Presentan una mejora de la actividad frente a gramnegativos como *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* y algunas enterobacterias; por el contrario, en general, la actividad sobre cocos grampositivos es menor que las de primera generación. Las **cefamicinas**, íntimamente relacionadas con las cefalosporinas, son activas frente a algunas enterobacterias por ser más estables a la hidrólisis por betalactamasas y muestran una gran actividad frente a algunas bacterias anaerobias. Las **cefalosporinas de tercera generación**, como la cefotaxima y la ceftriaxona, son muy activas frente a estreptococos incluyendo el neumococo, neisserias y hemófilos, y frente a bacilos gramnegativos como enterobacterias; la ceftazidima y la cefoperazona, son activas frente a *P. aeruginosa* y otros bacilos gramnegativos aerobios. Las **cefalosporinas de cuarta generación** muestran actividad frente a las enterobacterias y *P. aeruginosa*. También son activas frente a estreptococos y estafilococos, pero en estos últimos la actividad es inferior a la de las

cefalosporinas de primera generación. Todas las cefalosporinas son inactivas frente a enterococos, *L. monocytogenes* y estafilococos resistentes a metilcilina.

Las **carbapenémicos** son los betalactámicos con mayor espectro de actividad. Son activos frente a enterobacterias productoras y no productoras de betalactamasas, *P. aeruginosa* y otros bacilos gramnegativos aerobios. Carecen de actividad frente a los estafilococos resistentes a metilcilina, enterococos resistentes a ampicilina y *Stenotrophomonas maltophilia*.

A diferencia de otros betalactámicos, los carbapenémicos son estables frente a las enzimas BLEE y AmpC^{25, 39, 72} (que se mencionarán más adelante) pero son inactivados por las carbapenemasas, enzimas raramente descritas pero que están en aumento a nivel mundial^{49, 102}.

El aztreonam, único **monobactámico** disponible para uso clínico, posee una excelente actividad sobre bacterias gramnegativas aerobias. Por el contrario, carece de actividad frente a grampositivos y bacterias anaerobias.

Finalmente, los **inhibidores de betalactamasas** son moléculas que presentan escasa actividad intrínseca y se utilizan en combinación con penicilinas (amoxicilina-ác. clavulánico, ampicilina-sulbactam, ticarcilina-ác. clavulánico y piperacilina-tazobactam) para restaurar la actividad inicial del betalactámico en organismos que se han hecho resistentes por producción de betalactamasas (*Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides* spp.) y amplían el espectro a bacterias que no eran sensibles intrínsecamente por producción natural de estas enzimas (*K. pneumoniae*).

1.3. Resistencia antimicrobiana

1.3.1 Resistencia natural

Las bacterias poseen patrones propios de resistencia a los antimicrobianos que se denomina resistencia natural o intrínseca. Esta resistencia depende de funciones o estructuras codificadas generalmente en el cromosoma bacteriano.

1.3.2 Resistencia adquirida

Una bacteria puede adquirir resistencia mediante cambios precisos en el propio cromosoma bacteriano (mutaciones cromosómicas), que posteriormente la descendencia heredará, o bien mediante una transferencia de DNA foráneo. Los microorganismos pueden adquirir genes de resistencia de un microorganismo vecino, siendo éste de la misma especie o no. Este intercambio genético entre bacterias puede darse mediante tres procesos:

a. Transformación: El DNA es adquirido directamente a partir de una bacteria que ha liberado su material genético al exterior y es recogido por la bacteria receptora. Una vez dentro de la bacteria el DNA podrá mantenerse como tal cuando se trate de un elemento autónomo, o bien integrarse en el genoma del huésped por recombinación¹³⁹.

b. Transducción: Un bacteriófago interviene en el proceso transfiriendo los genes de resistencia entre bacterias compatibles. En la transducción el DNA está protegido del medio ambiente pudiendo sobrevivir largos periodos de tiempo. Es el método más restringido y específico, ya que el rango del huésped es

determinado por la interacción entre el bacteriófago y el receptor bacteriano. Se ha documentado la presencia de fagos portadores de genes que codifican betalactamasas en aguas residuales, además, algunas betalactamasas de bacterias gramnegativas se han visto asociadas a estructuras genéticas relacionadas con fagos^{90,107}.

c. Conjugación: La conjugación es la vía principal de diseminación de genes de resistencia entre las poblaciones bacterianas y consiste en la transferencia de genes entre dos células que están en contacto. Así, para que se produzca es imprescindible que las bacterias estén en contacto directo entre sí y por lo tanto es muy frecuente que ocurra entre bacterias que comparten nicho ecológico, como ocurre con las enterobacterias en el intestino. Los transconjugantes obtenidos adquieren propiedades de la bacteria donadora.

1.3.3. Elementos móviles de material genético.

El descubrimiento de los plásmidos en la década de los 70 supuso una revolución en el concepto de intercambio genético entre bacterias. Este concepto se amplió una década más tarde con la descripción de los primeros transposones y más recientemente, la presencia de integrones y de numerosas secuencias de inserción en las bacterias justifica la gran diseminación de genes de resistencia que hemos observado en los últimos años.

a. Secuencias de inserción

Son los elementos genéticos transponibles más sencillos. Tienen extremos inversamente repetidos que son reconocidos por una enzima responsable de la

transposición (transposasa) codificada por la porción central³⁴. También son frecuentes en el genoma de los bacteriófagos y plásmidos.

b. Transposones

Los transposones, son fragmentos de DNA móviles, capaces de insertarse en distintos lugares dentro del cromosoma bacteriano y “saltar” a otras localizaciones, incluyendo plásmidos o DNA de bacteriófagos. Dependen de la replicación de su huésped ya que son incapaces de replicarse autónomamente. Los transposones se clasifican en *transposones compuestos o de clase 1*, los cuales son segmentos de DNA flanqueados por dos secuencias de inserción iguales o muy similares de las cuales basta con que sólo una codifique una transposasa (TnpA) para llevar a cabo la transposición; y los *transposones no compuestos o de clase 2*, los cuales no tienen secuencias de inserción en los extremos y que se caracterizan por tener secuencias invertidas (*inverted repeats*, IR).

c. Integrones

Son estructuras sin capacidad de transposición “*per se*”. Están formados por tres elementos, necesarios para la captura y expresión de genes exógenos (genes cassette): un gen que codifica una integrasa (*int*), un punto de recombinación específico (*att*) y un promotor (P_{ant}) para la expresión de los genes cassette adyacentes. Los genes cassette son moléculas de DNA no replicativas que se encuentran como DNA circular libre y que se pueden encontrar también integrados en plásmidos o en el cromosoma. Aunque los genes estructurales presentes en los integrones son mayoritariamente genes de resistencia, también es

posible la integración de otro tipo de genes que probablemente no se observan con tanta frecuencia, porque no existe la presión selectiva necesaria para ponerlos de manifiesto⁵³.

d. Plásmidos

Los plásmidos son moléculas circulares de doble cadena de DNA, extracromosómicos y autorreplicables. Los genes que contienen no son imprescindibles para la supervivencia de la bacteria pero les confieren ventajas adaptativas; éste es el caso de los genes de resistencia. Los plásmidos pueden transportar desde únicamente los genes necesarios para su replicación hasta centenares de genes adicionales⁶⁰. Los elementos genéticos involucrados en la replicación plasmídica se agrupan en una unidad genética llamada replicon. En la región del replicon, usualmente de 2 a 3 kb de longitud, se encuentran los genes *cop* e *inc* que codifican las proteínas de control de inicio de la replicación, así como también las proteínas involucradas en el inicio de la replicación (*rep*) y otros elementos de control³³.

Los plásmidos proporcionan variedad de fenotipos: resistencia a los antibióticos³⁶, resistencia a metales pesados^{45, 61}, capacidad de degradar compuestos recalcitrantes y utilizarlos como fuentes de carbono y energía^{38, 50}, etc; ofreciendo así una ventaja selectiva a la célula huésped⁶¹.

- Clasificación de los plásmidos

La identificación y clasificación de los plásmidos es de suma importancia debido a varias razones: análisis de su distribución en la naturaleza y su

relación con las células huésped, descubrimiento de su parentesco genético y origen evolutivo y análisis de la transferencia genética horizontal, un proceso de gran impacto en la evaluación de riesgos de la liberación de organismos genéticamente modificados⁴⁸. El esquema de clasificación de los plásmidos se basa en los rasgos genéticos universalmente presentes y constantes. Una propiedad universalmente heredada por los plásmidos es la incompatibilidad³³. Por otro lado, también pueden clasificarse según la similitud de la secuencia aminoacídica de sus relaxasas⁴⁸.

- Relaxasas

Algunos plásmidos poseen una región móvil (MOB) que codifica componentes específicos del relaxosoma (complejo nucleoproteínico). Las relaxasas son componentes esenciales de este relaxosoma. Se tratan de proteínas esenciales cuya función es la de unir el DNA en el sitio del origen de la transferencia llamado *oriT*. Como resultado de la reacción, la relaxasa se une covalentemente al sitio *oriT* y origina un complejo nucleoproteínico que es transportado a la célula hospedadora por medio de un mecanismo conocido como el *type IV secretion system* (T4SS). El DNA ingresa a la célula huésped por medio de una proteína conocida con el nombre de *type IV coupling protein* (T4CP)^{35, 56, 80}. Según la similitud de las secuencias aminoacídicas y las propiedades de las relaxasas, los plásmidos conjugativos se pueden clasificar según su sistema de transferencia en seis familias: MOB_F, MOB_H, MOB_Q, MOB_C, MOB_P y MOB_V⁵⁶. Esta clasificación resulta interesante debido a que la prevalencia de un sistema MOB determinado puede dar información importante acerca de la preferencia ecológica de

algunos tipos de plásmidos, pero el conocimiento de estos sistemas es aún escaso.

- Incompatibilidad plasmídica y plásmidos en Enterobacterias

La incompatibilidad plasmídica (*Inc*) es la incapacidad de que dos plásmidos se propaguen de manera estable en la misma célula. Dicho de otro modo, si la introducción de un segundo plásmido desestabiliza la replicación del primero, se dice que los dos son incompatibles¹⁰⁶.

Actualmente son 27 *Inc groups* los reconocidos por el *Plasmid Section of the National Collection of Type Cultures* (Londres, Reino Unido) que incluye seis *IncF* (de FII a VII) y tres variantes de *IncI* (I1, I γ , I2)¹⁹. Actualmente el método más adecuado para tipificar los plásmidos es la *PCR-based replicon typing* (PBRT)²⁰, que detecta los replicones de la mayoría de las familias plasmídicas que se encuentran en las enterobacterias (HI2, HI1, I1- γ , X, L/M, N, FIA, FIB, FIC, W, Y, P, A/C, T, K, B/O y FII).

Algunos plásmidos se encuentran asociados con genes de resistencia y al presentar una elevada prevalencia se les puede llegar a considerar epidémicos. Esto podría estar asociado a una selección positiva mediada por el uso de antimicrobianos.

La adquisición de genes de resistencia a antimicrobianos por parte de plásmidos virulentos puede representar una nueva herramienta en la evolución bacteriana, implementando estrategias adaptativas para explorar y colonizar nuevos huéspedes y ambientes.

1.3.4. Mecanismos de resistencia a los betalactámicos

a. Alteración de la diana: Un primer mecanismo de resistencia son las alteraciones de las proteínas fijadoras de penicilina PBP (penicillin binding proteins), que son las dianas de los betalactámicos. Estas alteraciones se dan por mutaciones puntuales. La bacteria se hace resistente porque disminuye la afinidad de la PBP por el antibiótico manteniendo en parte su función fisiológica⁹⁵. Este mecanismo se ha descrito en grampositivos como *Staphylococcus aureus*⁶⁵, *Streptococcus pneumoniae*⁶³ o *Enterococcus*¹⁴¹; y en gramnegativos como *Haemophilus influenzae*⁸⁶, *Proteus mirabilis*¹⁰⁰ o neisserias⁴⁴.

b. Alteración de la membrana externa: Para atravesar la membrana externa los betalactámicos necesitan la presencia de un canal de origen proteico (porinas). Estas proteínas conocidas genéricamente como *Outer Membrane Protein* (OMP) se agrupan en función de la especificidad que tienen por el sustrato^{76, 103} y pueden ser desde mínimamente selectivas hasta altamente específicas. Las proteínas implicadas en la resistencia a los antimicrobianos pertenecen en su mayoría a las mínimamente selectivas. La alteración de la permeabilidad de la membrana externa se debe generalmente a mutaciones cromosómicas⁶².

c. Sistema de expulsión activa: Éstos impiden la llegada del antibiótico a su diana. En ocasiones, se activan una serie de proteínas que provocan la salida del antibiótico por un mecanismo de expulsión activa, impidiendo que se acumule en cantidad suficiente para que sea efectivo. Este mecanismo se ha estudiado ampliamente en *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *S. enterica*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* y aunque confieren principalmente resistencia a quinolonas también afecta a la sensibilidad a los betalactámicos^{89, 138}.

d. Producción de enzimas que inactivan o modifican al antimicrobiano: Las bacterias pueden producir determinadas enzimas que inactivan al antibiótico, como por ejemplo, las betalactamasas. En las enterobacterias, el mecanismo de resistencia principal a los betalactámicos es la producción de betalactamasas^{15, 76}.

1.4. Las betalactamasas

La resistencia a antibióticos betalactámicos se puede producir por la acción simultánea de varios mecanismos, y en el caso de las enterobacterias, el más importante por su frecuencia y eficacia es la producción de betalactamasas. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma, en plásmidos, en transposones o integrones; y pueden producirse de manera constitutiva o inducible. Las betalactamasas cromosómicas son universales en una bacteria específica mientras que la presencia de las codificadas por plásmidos es variable y transferible entre las diversas especies bacterianas⁶⁶. Los microorganismos gramnegativos producen una amplia variedad de betalactamasas de mediación plasmídica o cromosómica.

1.4.1. Mecanismo de acción

Las betalactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico antes que el antibiótico llegue al punto de unión con las PBP (proteínas fijadoras de penicilina). Se unen a los betalactámicos mediante un enlace no covalente, posteriormente tiene lugar una acilación entre el grupo éster del anillo betalactámico y el grupo hidroxilo libre del residuo de serina (en el caso de las betalactamasas de clase A, C y D) del centro activo de la enzima. Finalmente la enzima que se encuentra activa, es liberada y el antibiótico inactivado¹³⁶.

Aunque todas las betalactamasas catalizan la misma reacción, se han aislado y caracterizado numerosos tipos de enzimas que se clasifican en forma diversa de

acuerdo, por ejemplo, a su secuencia de aminoácidos, peso molecular o especificidad del sustrato.

1.4.2. Clasificación

La continua aparición de nuevas betalactamasas ha creado problemas en su clasificación y nomenclatura. En un principio, su nombre hacía referencia a aspectos tan diversos como: el sustrato sobre el que actúa (CARB, OXA), sus propiedades bioquímicas (SHV), la bacteria que la produjo por primera vez (PSE descrita por primera vez en *Pseudomonas aeruginosa*), el paciente del que procedía la muestra (TEM, ROB) o el hospital donde estaba ingresado el paciente (MIR, RHH) y el estado al que pertenecía (OHIO), no pudiendo faltar las iniciales de los autores que las describieron por primera vez (HMS). Actualmente se conocen más de 340 enzimas (www.lahey.org/studies/).

La clasificación propuesta por Jack y Richmond en 1970⁷¹ y posteriormente ampliada por Richmond y Stykes en 1973¹¹⁹, fue la que se utilizó hasta que Bush en el año 1989 propusiera una clasificación basada en la actividad enzimática o afinidad de los enzimas por diferentes sustratos y su sensibilidad a la acción inhibitoria por el ácido clavulánico. Esta clasificación, revisada en 1995 por Bush, Jacoby y Medeiros¹⁵ y actualizada por Bush y Jacoby en el año 2010¹⁴, es la que se utiliza en la actualidad.

Por otro lado Ambler (1980)¹ propuso una clasificación en función de los mecanismos de interacción enzima-sustrato y la secuencia de aminoácidos de las betalactamasas en la que distinguen cuatro clases de enzimas designados como A, B, C y D. Tanto la clasificación de Bush-Jacoby como la de Ambler están relacionadas (Tabla 2).

Tabla 2: Clasificación de las betalactamasas según su grupo funcional (Bush, Jacoby y Medeiros) y clase molecular (Ambler)¹⁴.

Grupo Bush-Jacoby (2009)	Grupo Bush-Jacoby (1995)	Clase molecular (subclase)	Sustrato preferencial	Inhibidos por		Betalactamasas representativas
				CLV ^a o TZ ^b	EDTA	
1	1	C	Cefalosporinas	-	-	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI ^c	C	Cefalosporinas	-	-	GC1, CMY-37
2a	2 ^a	A	Penicilinas	+	-	PC1
2b	2b	A	Penicilinas, Cefalosporinas 1 ^a G	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporinas 1 ^a -4 ^a G Monobactámicos	+	-	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	-	-	TEM-30, SHV-10
2ber	NI ^c	A	Cefalosporinas 1 ^a -4 ^a G	-	-	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicilina	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4, CARB-3
2ce	NI ^c	A	Carbenicilina, cefepime	+	-	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilina	Variable	-	OXA-1-10
2de	NI ^c	D	Cefalosporinas 1 ^a -4 ^a G	Variable	-	OXA-11, OXA-15
2df	NI ^c	D	Carbapenémicos	Variable	-	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas 1 ^a -4 ^a G	+	-	CepA
2f	2f	A	Carbapenémicos	Variable	-	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Carbapenémicos	-	+	IMP-1, VIM-1, Cer-A, IND-1
		B (B3)				L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenémicos	-	+	CphA, Sfh-1
NI	4	Desconocido				

^a CLV: ácido clavulánico, ^b Tazobactam, ^c No incluido, 1^a - 4^a G: Primera a cuarta generación

a. **Betalactamasas del grupo 1.** Según la clasificación de Bush-Jacoby se corresponderían con las de clase C de Ambler. Se caracterizan por hidrolizar la mayoría de betalactámicos excepto el imipenem, resaltando el hecho que son capaces de hidrolizar las cefamicinas y que no se inhiben con ácido clavulánico. Se incluyen en este grupo las betalactamasas cromosómicas inducibles de *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia*, *M. morgani* y *P. aeruginosa*; y la cromosómica constitutiva de *E. coli*^{66, 111}. Pertenecen también a este grupo enzimas codificadas en plásmidos y que actualmente han ido en aumento. Éstas poseen un patrón de resistencia indistinguible de las cromosómicas y además se expresan constitutivamente y no son inducibles (con excepción de la DHA, CMY-13 y ACT). Se han descrito alrededor del mundo en *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *S. enterica*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *M. morgani* y *K. oxytoca*^{66, 111}. Dentro de este grupo encontramos el subgrupo 1e que se caracteriza por presentar una mayor actividad frente a ceftazidima y el resto de oxyimino- β -lactámicos. Este grupo de enzimas se les ha denominado también “Extended-spectrum AmpC” (ESAC). Entre ellas encontramos la GC1 de *E. cloacae*, la CMY-10, la CMY-19 y la CMY-37.

b. **Betalactamasas del grupo 2:** está formado por doce subgrupos (2a, 2b, 2be, 2br, 2ber, 2c, 2ce, 2d, 2de, 2df, 2e y 2f) corresponden a la clase A de Ambler excepto los subgrupos 2d, 2de y 2df que corresponden a la clase D. En el **subgrupo 2a** se engloban las penicilinasas de bacterias grampositivas y son inhibidas por el ácido clavulánico. El **subgrupo 2b** comprende la mayoría de betalactamasas de amplio espectro, que hidrolizan las penicilinas y, si se expresa de manera elevada, pueden conferir resistencia a cefalosporinas de primera generación. Son inhibidas por el ácido clavulánico. Las más frecuentes son las tipo TEM (de codificación

plasmídica) y SHV (plasmídica o cromosómica). De éstas derivan una parte de las enzimas del **subgrupo 2be**, que comprende las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) que confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas de primera generación, cefalosporinas de segunda (excepto cefamicinas), cefalosporinas de tercera y a monobactámicos, y de las cuales se hablará más adelante; y el **subgrupo 2br**, betalactamasas resistentes a los inhibidores, que derivan en su mayoría de las tipo TEM y por eso inicialmente recibieron el nombre de IRT (*Inhibitor Resistant TEM-Type*). Estas últimas se caracterizan por presentar el mismo perfil de hidrólisis que las de amplio espectro pero son resistentes a los inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico, el tazobactam o el sulbactam. El **subgrupo 2ber** incluye enzimas TEM que tienen combinan una cierta resistencia a la inhibición por el ácido clavulánico junto a una mayor actividad frente a oxymino- β -lactámicos. También se les ha denominado *complex mutant* TEM (betalactamasas CMT). Dentro de los **subgrupos 2c y 2d** se encuentran las denominadas carbecilinasas y oxacilinasas respectivamente. Su perfil de acción es similar al de las betalactamasas de amplio espectro pero son más resistentes a la acción del ácido clavulánico. Algunas oxacilinasas han adquirido la capacidad de hidrolizar los carbapenémicos¹⁰⁹. El **subgrupo 2ce** incluye la carbecililasa recientemente descrita RTG-4 (CARB-10) con actividad ampliada contra cefepime y ceftirome. En el nuevo **subgrupo 2de** se encuentran las enzimas que hidrolizan la cloxacilina u oxacilina, además tienen un espectro extendido que incluye los oxymino- β -lactámicos pero no los carbapenémicos; y también su resistencia a la ceftazidima es usualmente más pronunciada que la resistencia cefotaxima o aztreonam. El nuevo **subgrupo 2df** incluye enzimas OXA con actividad frente a carbapenems que aparecen de manera frecuente en *A.*

baumannii. A pesar de que las enzimas del subgrupo 2d se definen funcionalmente de acuerdo a su habilidad de hidrolizar la cloxacilina u oxacilina, sólo algunas enzimas del subgrupo 2df han sido probadas con estos sustratos, de éstas, la OXA-50 no hidroliza la oxacilina.

En el **subgrupo 2e** están las cefalosporinasas cromosómicas y pertenecen a la clase A de Ambler a diferencia de las cefalosporinasas del grupo 1 que pertenecen a la clase C; son inhibidas por el ácido clavulánico. En el **subgrupo 2f** se encuentran las carbapenemasas plasmídicas de la clase A de Ambler.

- c. **Betalactamasas del grupo 3:** se divide según su estructura en tres subclases (B1, B2 y B3) o según su función (subgrupos 3a, 3b y 3c) grupos que se diferencian tanto por el perfil de hidrólisis como por la estructura molecular. Todos pertenecen a la clase B de Ambler y necesitan cationes divalentes, principalmente el zinc, para su acción enzimática. Son inactivadas por agentes quelantes como el EDTA. Su perfil hidrolítico incluye a todos los betalactámicos (incluyendo cefamicinas y carbapenémicos, pero no el aztreonam) y no se inhiben con el ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam.
- d. **Betalactamasas del grupo 4:** que incluye la penicilinasa de *Burkholderia cepacia*, que no se incluye en ninguna clase de Ambler. Al parecer estas enzimas podrían incluirse en alguno de los grupos antes mencionados pero hasta el momento no están completamente caracterizadas.

1.4.3. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

La aparición de bacterias productoras de BLEE, tiene importantes repercusiones clínicas y terapéuticas tanto por su amplio espectro de actividad frente a los betalactámicos, como porque la mayoría de los aislamientos tienen codificada esta resistencia en plásmidos que pueden ser transmitidos a otros microorganismos. Así, el aislamiento de cepas productoras de BLEE limita considerablemente las opciones terapéuticas.

A principios de los años 80, aparecieron las primeras betalactamasas plasmídicas sintetizadas por microorganismos gramnegativos con actividad sobre cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima). Aunque en un principio se encontraron únicamente en especies muy concretas localizadas en un ámbito geográfico limitado, muy pronto se extendieron por toda Europa, EEUU y el resto de países, y cada vez son más los microorganismos en las que se han descrito algún tipo de BLEE.

El espectro de actividad de las BLEE incluye casi todas las penicilinas, cefalosporinas (excepto cefamicinas) y monobactámicos, además estas enzimas se caracterizan por ser inhibidas por el ácido clavulánico. El número de variantes de BLEE identificadas han ido en constante aumento desde 1983, demostrando su rápida evolución⁵⁷. Actualmente se conocen más de 200 enzimas bajo la denominación BLEE, aisladas de diferentes especies de enterobacterias y de *P. aeruginosa* y encontradas en diferentes países. La prevalencia de cada una de ellas puede variar considerablemente de un país a otro o entre hospitales de un mismo país¹².

Las primeras BLEE derivaban por mutaciones puntuales de las betalactamasas TEM-1, TEM-2 y SHV-1, que presentan una o más sustituciones en la secuencia aminoacídica, lo que les confiere capacidad para remodelar el centro activo de la enzima, siendo capaces de hidrolizar no sólo penicilinas o cefalosporinas de primera generación, sino también las de tercera y cuarta generación⁷⁵.

Estas mutaciones en las diversas BLEE conocidas, no necesariamente les confieren capacidad para hidrolizar a los mismos sustratos, por ejemplo, TEM-7 hidroliza ceftazidima y cefotaxima con la misma efectividad, mientras que, SHV-2 hidroliza la cefotaxima cerca de 10 veces más rápido que la ceftazidima.

Un estudio multicéntrico realizado en el año 2000 en 40 hospitales de España para la detección de BLEE en *E. coli* y *K. pneumoniae* encontró que el 92,5% de los hospitales participantes remitió cepas productoras de BLEE. En más del 50% de los casos, los microorganismos productores de estas enzimas se aislaron en pacientes de la comunidad⁶⁹.

Las BLEE predominantes en Europa fueron inicialmente las de tipo SHV, mientras que en la actualidad comienzan a ser frecuentes nuevas variantes de tipo CTX-M. De hecho en España ha habido un cambio drástico en los últimos años, siendo las de tipo CTX-M las BLEE predominantes^{31, 88}.

La mayoría de estas betalactamasas se han localizado en plásmidos conjugativos lo que predice el modo de adquisición de las mismas a partir de otras bacterias resistentes. Estudios realizados *in vitro* han probado como la flora normal del intestino y más concretamente *E. coli*, puede actuar como reservorio de genes de resistencia y actuar

como un factor de diseminación de genes entre los distintos patógenos intestinales como *Salmonella*⁴. Otros genes codificantes de betalactamasas se han localizado formando parte de cassettes de integrones situados tanto en DNA plasmídico como en DNA cromosómico; es el caso de la CTX-M-9 en el integrón In60¹²³.

A continuación se definirán los cuatro tipos de enzimas BLEE más destacados: TEM, SHV, CTX-M y OXA. Los tres primeros pertenecen a la clase A de Ambler y grupo 2be de Bush-Jacoby-Medeiros. El último pertenece a la clase D y grupo 2de de Bush-Jacoby¹⁴.

- a. **TEM:** La enzima TEM-3 fue la primera BLEE tipo TEM descrita en 1984¹²⁷ fruto de una mutación puntual de la enzima TEM-2. Aunque la mayoría de betalactamasas tipo TEM han sido descritas en *K. pneumoniae* y *E. coli*, también se han observado en otros géneros de enterobacterias como *E. aerogenes*, *P. mirabilis*, *M. morgani*, *S. enterica* o *Providencia rettgeri*^{5, 82}. Como BLEE derivadas de TEM se han descrito desde la TEM-3 a la TEM-29 (siendo la TEM 24 la más frecuente en España), TEM-42, TEM-43, TEM-46 a la TEM-50, TEM-52 a la TEM-58, TEM-60 a la TEM-64, TEM-66 a la TEM-72, TEM-75, TEM-80, TEM-85 a la TEM-167, dentro de las cuales existen enzimas que hidrolizan la cefotaxima y ceftazidima (por ejemplo las TEM-4), otras que presentan preferencia por la hidrólisis de ceftazidima (por ejemplo la TEM-5, TEM-7, TEM-12, TEM-16); otras que hidrolizan preferentemente la cefotaxima (por ejemplo TEM-3, TEM-20, TEM-25) y otras que hidrolizan preferentemente el aztreonam como la TEM-22.
- b. **SHV:** A diferencia de las betalactamasas tipo TEM, hay relativamente pocos derivados de SHV. De la misma manera que en el caso anterior, hay enzimas tipo

SHV que tienen actividad hidrolítica preferente por cefotaxima y ceftazidima (SHV-2, SHV-12), otras que hidrolizan más rápidamente la cefotaxima que la ceftazidima o el aztreonam como la SHV-3 y otras que muestran preferencia por la ceftazidima (SHV-4, SHV-6). La mayoría de BLEE tipo SHV se han encontrado en cepas de *K. pneumoniae*, aunque estas enzimas también se han descrito en *C. koseri*, *E. coli* y *P. aeruginosa*^{13, 64, 93}. La enzima SHV-12 se ha descrito en todo el mundo y se ha encontrado en cepas aisladas de animales y humanos^{28, 87}.

- c. **CTX-M:** Han sido descritas principalmente en *E. coli*, aunque se han encontrado en otras enterobacterias. Se han convertido en el grupo de BLEE más descrito durante los últimos 10 años, especialmente en Europa y Sud-América¹⁷. Las cepas de *E. coli* productoras de estas betalactamasas y aisladas del hospital y la comunidad, a menudo presentan coresistencia a trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, gentamicina, tobramicina y ciprofloxacino¹¹². La presencia de estas enzimas se ha descrito en diferentes especies de la familia *Enterobacteriaceae* y en zonas geográficas muy distintas, la mayoría de sus genes de codificación plasmídica. La divergencia de la secuencia aminoacídica así como la dispersión temporal y espacial de las cepas que expresan estas betalactamasas hace difícil predecir su origen. Se cree que alguna de las betalactamasas plasmídicas tipo CTX-M derivan de la betalactamasa cromosómica de *Kluyvera ascorbata* o *K. cryocrescens*, con las cuales muestran una alta homología⁹⁸.

Cabe destacar la existencia de ciertas enzimas identificadas inicialmente en zonas concretas de Europa occidental como la CTX-M-9 y CTX-M-14^{52, 97, 124} y la CTX-M-10¹⁸. Actualmente, las enzimas CTX-M-14, CTX-M-3, CTX-M-15 y CTX-M-2 son las que tienen una mayor dispersión geográfica localizándose, incluso, en

cepas aisladas de animales sanos, lo cual sugiere que éstos podrían comportarse como reservorio de cepas productoras de estas β -lactamasas¹⁰.

- d. OXA:** Las betalactamasas tipo OXA se caracterizan por tener una elevada afinidad por la oxacilina y la cloxacilina y por ser poco inhibidas por el ácido clavulánico. Según el grado de homología de las secuencias nucleotídicas se dividen en 9 grupos, dentro de los cuales algunos enzimas presentan actividad frente a cefalosporinas de 3^a y 4^a generación y/o aztreonam¹¹⁵. Estas betalactamasas plasmídicas de espectro extendido raramente se han encontrado en enterobacterias y son predominantes en *P. aeruginosa*^{133, 137}. Se caracterizan por hidrolizar preferentemente la cefotaxima y una menor actividad frente al aztreonam, además son poco inactivadas por el ácido clavulánico.
- e. Otras BLEE:** La betalactamasa PER-1 se describió por primera vez en una cepa de *P. aeruginosa* aislada en Turquía¹⁰⁴. Después se encontró en cepas de *S. enterica* serovar Tiphymurium¹³⁴ y *Acinetobacter baumannii*¹³⁵. PER-1 está dispersa por Turquía encontrada en el 60% de las cepas de *A. baumannii* resistentes a ceftazidima. Una enzima relacionada, PER-2, que tiene un 86% de homología con PER-1, fue encontrada en *S. enterica* serovar Tiphymurium en Argentina⁶. VEB-1, encontrada por primera vez en una cepa de *E. coli* aislada de un paciente de Vietnam, fue descrita también en Tailandia en una cepa de *P. aeruginosa*⁹⁴. CME-1, aislada de *Chryseobacterium meningosepticum*^m en Italia¹²²; TLA-1, descrita en una cepa de *E. coli*¹²⁶ en México; SFO-1, encontrada en *Enterobacter cloacae*⁸⁴; GES-1 descrita en una cepa de *K. pneumoniae*¹¹⁴ aislada en Francia y GES-2 descrita en *P. aeruginosa*¹¹⁶ en Sud-África son otras BLEE poco frecuentes no relacionadas con ninguna familia de BLEE.

1.4.4 Detección de BLEE

La detección de las BLEE en la rutina de un laboratorio de microbiología clínica no siempre es fácil, y debe tenerse en cuenta pequeñas disminuciones de sensibilidad a C3G (incremento de la concentración inhibitoria mínima, CIM, o halo de inhibición disminuido), presencia de sinergia entre C3G o C4G y el ácido clavulánico, bordes de los halos de inhibición irregulares, así como resistencias asociadas especialmente a aminoglucósidos y quinolonas.

Se han desarrollado muchos test fenotípicos para la detección de BLEE desde los años 80. Todos ellos se fundamentan en la actividad inhibitoria del ácido clavulánico.

Durante estos años han existido diferentes criterios y recomendaciones regulados por varias organizaciones que establecen los puntos de corte y estudian los aspectos técnicos de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana realizadas *in vitro*. Entre ellos tenemos el CA-SFM²⁶ en Francia, el DIN⁴⁰ en Alemania, el CRG²⁷ en Países Bajos, el NWGA⁸ en Noruega y el SRGA¹³² en Suecia. En este estudio hemos utilizado los criterios y recomendaciones del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*)²² y del EUCAST (*The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)¹³¹.

Independientemente del valor de sensibilidad obtenido en el laboratorio, existía un consenso para informar la sensibilidad de los microorganismos portadores de BLEE, dando el resultado como intermedios o resistentes a todas las cefalosporinas (incluyendo cefalosporinas de tercera y cuarta generación excepto

cefamicinas), y las asociaciones con inhibidores se mantendrían activas para el tratamiento de las infecciones urinarias según el CA-SFM²⁶.

Actualmente la interpretación del antibiograma y establecimiento de los puntos de corte han generado un gran debate, y, tanto el CLSI²² como el EUCAST¹³¹ proponen considerar la sensibilidad a estas cefalosporinas indistintamente del mecanismo de resistencia implicado según los nuevos puntos de corte propuestos. De esta manera se propone la posibilidad de utilizar las cefalosporinas de tercera y cuarta generación en el tratamiento de las infecciones por bacterias portadoras de BLEE⁹⁹. Sin embargo, cabe resaltar que tanto la detección como la caracterización de las BLEE son de vital importancia para estudios de vigilancia epidemiológica.

Así, entre los métodos de *screening* recomendados para la detección de BLEE tenemos:

a. Método de disco difusión: En esta prueba se puede determinar el patrón fenotípico del aislado, observando la resistencia a penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, sensibilidad a cefoxitina, reducción significativa de alguna cefalosporina de tercera o cuarta generación o aztreonam, y además se observa un efecto de sinergia de los compuestos anteriores con el ácido clavulánico. También se le conoce con el nombre de prueba de doble difusión (Figura 8 y 9a).



Figura 8: Patrón de resistencia característica de la betalactamasa CTX-M-9. AMP, ampicilina; PIP, piperacilina; CEP, cefazolina; NAL, ac. nalidíxico; CXM, cefuroxima; CAZ, ceftazidima; CFO, ceftioxitina; CIP, ciprofloxacino, CTX, cefotaxima, AMC, amoxicilina-ac. clavulánico; FEP, cefepime, PI+TZ, piperacilina-tazobactam; AZT, aztreonam; IMI, imipenem.

Otras variantes son la utilización de discos cargados con una cefalosporina de tercera o cuarta generación y otros discos con el mismo betalactámico más ácido clavulánico. Según el CLSI una disminución de ≥ 5 mm en el halo de inhibición cuando se prueba en combinación con ácido clavulánico comparado con el diámetro del halo cuando se prueba sin ácido clavulánico confirma la producción de BLEE.

b. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM): Se trata de la mínima concentración del antibiótico, expresado en mg/L, capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. Según el CLSI una disminución ≥ 3 diluciones en la CIM de una cefalosporina cuando se prueban en combinación con ácido

clavulánico, comparado con la CIM cuando se prueba sin ácido clavulánico confirma la producción de BLEE.

Tanto el CLSI como el EUCAST han estado debatiendo si los nuevos puntos de corte de la CMI establecidos para enterobacterias pueden predecir el éxito o fracaso clínico incluso sin pruebas auxiliares de detección, entrando en debate si realmente es necesaria la búsqueda de la presencia o ausencia de BLEE antes de emitir el informe de sensibilidad. Ambos comités llegaron a la conclusión de que, si el punto de corte es correcto puede llegarse a obviar la necesidad de detectar las BLEE para predecir el éxito clínico, pero siempre teniendo claro que tanto la detección como la caracterización son de vital importancia para estudios de vigilancia epidemiológica.

c. Otras pruebas comerciales:

Entre ellos tenemos la técnica de difusión en gradiente como las tiras de *Epsilon-Test (E-Test)*, las cuales generan un gradiente de concentración de la cefalosporina sobre el medio, en un extremo puede contener ceftazidima (gradiente de 0,5-32 mg/L), cefotaxima (gradiente de 0,25-16 mg/L), o cefepime (gradiente de 0,25-16 mg/L); y en el otro extremo ceftazidima (gradiente de 0,0064-4 mg/L), cefotaxima (gradiente de 0,016-1 mg/L), o cefepime (CIM *test range* 0,0064-4 mg/L), en combinación con 4 mg/L de ácido clavulánico (Figura 9b). Una disminución en la CIM ≥ 3 diluciones en la presencia del ácido clavulánico confirma la producción de BLEE.

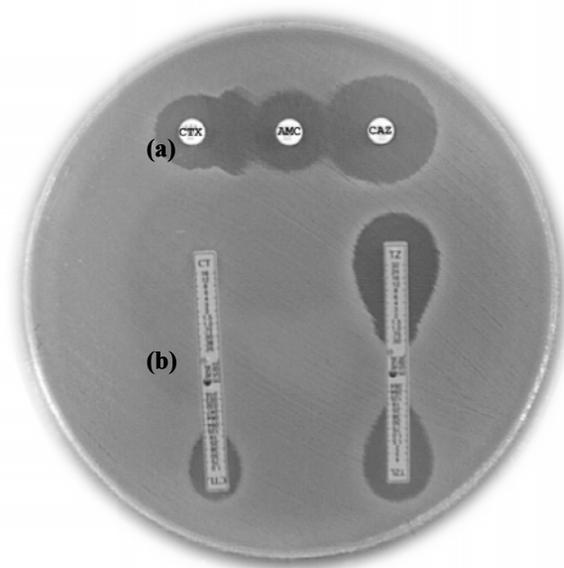


Figura 9. (a) Prueba de doble difusión en disco, estudio de sinergia. (b) Método del *E-test*

Cica-Beta Test I, el cual detecta BLEE directamente de colonias aisladas mediante un protocolo de 15 minutos (se considera sólo como un test de screening rápido). Este test se fundamenta en la actividad hidrolítica de las betalactamasas al hidrolizar la oxymino-cefalosporina cromogénica HMRZ-86, así como del efecto inhibitor de diferentes sustancias como el ácido clavulánico, el ácido borónico y el ácido mercaptoacético más EDTA^{78,118}.

d. Sistemas automatizados: en los laboratorios clínicos de rutina cada vez se emplean más los sistemas automatizados puesto que implica una disminución en el tiempo de detección y mejora la relación coste-eficacia. Numerosos estudios han informado sobre la precisión y las limitaciones de estos sistemas^{16,128} lo cual obliga al fabricante a realizar constantes mejoras y actualizaciones de software. Entre ellos tenemos los sistemas Vitek 2[®] (BioMerieux), MicroScan

WalkAway[®] (Siemens), Sensititre[®] (Trek Diagnostics Systems) y BD Phoenix[®] (Becton Dickinson).

e. Métodos moleculares:

Debido a que la detección fenotípica de las BLEE implica un tiempo de espera a considerar y los resultados muchas veces pueden ser difíciles de interpretar, se ha desarrollado diferentes aproximaciones moleculares. La mayoría de estas aproximaciones son adaptaciones propias de cada centro aunque ya empiezan a aparecer sistemas comerciales con capacidad para detectar BLEE. Uno de ellos y quizás el mas versátil por su amplio abanico de betalactamasas que puede detectar es *Check-Points ESBL Array* (Hain Lifesciences) capaz de detectar BLEE, KPC, AmpC (CMY, DHA, FOX, MOX, ACC, MIR y ACT) y carbapenemasas (VIM, IMP, ND1 y OXA-48). Este método se basa en una primera reacción de ligación con múltiples iniciadores seguida de una amplificación y una hibridación en un array de baja densidad^{24, 92}.

1.5. Antecedentes históricos y contextualización de la presente tesis doctoral.

En España, la aparición de las enzimas BLEE ha sido aparentemente tardía describiéndose, por primera vez, microorganismos productores de BLEE en el año 1988. Posteriormente se fueron realizando diversos estudios con diferentes prevalencias.

Así, entre los años 1993 y 1995 se detectó en el Hospital de Bellvitge (Barcelona) un brote causado por *K. pneumoniae* portador de BLEE¹¹⁰. En el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona) entre los años 1994 y 1996, sólo el 0,14% de *E. coli* y el 0,17% de *K. pneumoniae*, eran portadoras de BLEE, detectándose TEM-12, SHV-2 y CTX-M-9¹²⁴.

En el Hospital Ramón y Cajal (Madrid) durante el periodo 1989-2000 se encontró que las cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE constituían un 4,8% del total y se observaron hasta seis BLEE diferentes (TEM-4, SHV-2, SHV2a, SHV-5, CTX-M-10 y CTX-M-9)³⁰. Finalmente, en un estudio multicéntrico español del año 2000 se encontró una prevalencia de BLEE del 0,5 y 2,7% en *E. coli* y *K. pneumoniae* respectivamente⁶⁸.

Así, en varios hospitales nacionales se fue constatando un incremento en la prevalencia de microorganismos portadores de BLEE, y además se observó que la diversidad en el tipo de BLEE encontradas también iba en aumento, incluso en un mismo centro. Es por esto que se planteó un nuevo estudio a nivel nacional para conocer la evolución de estas BLEE y su prevalencia en España (**Artículo I**).

Una vez determinada la prevalencia de estas enzimas y observado el incremento, surgió la cuestión de cuáles eran los mecanismos implicados en esta capacidad de difusión; si se trataba de la difusión de unos clones concretos o si se trataba de la difusión de elementos

móviles como plásmidos, secuencias de inserción u otros elementos, con lo cual se planteó el estudio del entorno genético de los genes *bla*_{BLEE} (**Artículo II**).

Por último, se consideró de interés conocer la estructura poblacional de las cepas de *E. coli* portadoras de BLEE. Para ello se seleccionaron cepas no relacionadas epidemiológicamente (con diferentes patrones de PFGE) para determinar el ST por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) y el grupo filogenético (**Artículo III**).

2. OBJETIVOS

*“Los objetivos son los ingredientes que dan
propósito a nuestra vida”*

Anónimo

2. OBJETIVOS

1. Caracterizar y establecer la relación clonal de las cepas portadoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* aisladas en once hospitales españoles, durante el período enero-marzo del 2004 (Artículo I).
2. Caracterizar los plásmidos donde se localizan los genes *bla*_{BLEE} y los entornos genéticos de dichos genes (Artículo II).
3. Conocer la estructura poblacional de *E. coli* portadora de BLEE (Artículo III).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

“No basta con alcanzar la sabiduría, es necesario saber utilizarla”

Marco Tulio Cicerón

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización y epidemiología de las BLEE (Artículo I)

3.1.1 Selección de las cepas

Las cepas objeto de estudio fueron aisladas durante el primer trimestre del año 2004 de muestras patológicas de pacientes atendidos en 11 hospitales españoles: Corporació Hospitalària Parc Taulí (CPT) de Sabadell, Hospital Germans Trias i Pujol (HGTP) de Badalona, Hospital Vall d'Hebron (HVH) de Barcelona, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSP) de Barcelona, Hospital Clínic (HC) de Barcelona, Hospital de Bellvitge (HB) de l'Hospitalet, Hospital Son Dureta (HSD) de Mallorca, Hospital de la Ribera (HR) de Alzira, Hospital Virgen de la Macarena (HVM) de Sevilla, Hospital Virgen del Rocío (HVR) de Sevilla, y Hospital Ramón y Cajal (HRC) de Madrid. Se estableció enviar sólo los 15 primeros aislamientos de *E. coli* y los 5 primeros de *K. pneumoniae* con sospecha de ser portadores de BLEE considerando sólo una cepa por paciente (el número de aislamientos obtenidos varió en cada hospital). Esto supuso un total de 142 cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE: 15 en el HGTP, HVH, HRC, HVR y HC; 14 en el HSP, CPT y HSD; 11 en el HVM; 10 en el HB; y 4 en el HR.

De las 142 cepas, 102 cepas fueron *E. coli* y 40 *K. pneumoniae*. Se descartaron 18 cepas (10 *E. coli* y 8 *K. pneumoniae*) por presentar un fenotipo compatible con hiperproducción de su betalactamasa cromosómica. Por lo tanto, se incluyeron un total de 92 cepas de *E. coli* y 32 de *K. pneumoniae* para la caracterización de las BLEE.

Para la caracterización de los plásmidos y la determinación de los entornos de los genes *bla* se seleccionaron 58 cepas (40 de *E. coli* y 18 de *K. pneumoniae*) en función de la prevalencia de cada tipo de BLEE encontrada. Y, por último, se determinaron los tipos de MLST y grupos filogenéticos de las 92 cepas de *E. coli*.

Las 124 cepas portadoras de BLEE fueron aisladas de 54 (43%) varones y 70 (57%) mujeres. En función del tipo de infección, el 51,6% fueron infecciones nosocomiales, mientras que el 48,4% fueron comunitarias.

Al desglosar estas características epidemiológicas en función del microorganismo aislado, se observó que la infección por *E. coli* tuvo lugar en 34 varones (37%) y en 58 mujeres (63%); en 39 de los casos (42,4%) fueron infecciones nosocomiales y en 53 (57,6%) comunitarias. Por el contrario, la infección por *K. pneumoniae*, tuvo lugar en 20 varones (62,5%) y 12 (37,5%) mujeres; en 25 casos (76%) fueron infecciones nosocomiales y en 7 (25%) comunitarias. La diferencia en la prevalencia de infecciones nosocomiales por *K. pneumoniae* y *E. coli* resultó significativa (76% vs 42% $p=0,001$).

Los servicios de los que provenían los pacientes con infección intrahospitalaria por *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE fueron principalmente: medicina interna (48,7% y 44% respectivamente), cirugía (25,6% y 16%), unidad de cuidados intensivos (12,8% y 20%), pediatría (7,7% y 4%), consultas externas (2,6% y 4%) y otros (2,6% y 12%). En ningún caso las diferencias llegaron a ser estadísticamente significativas. Las cepas de *E. coli* productoras de BLEE se aislaron de orinas (68,5%), sangre (10,9%), exudados (8,7%), muestras respiratorias (3,3%), líquidos estériles (2,2%), catéteres (1,1%), y otras muestras (5,4%); y las cepas de *K.*

pneumoniae productoras de BLEE se aislaron de orinas (43,8%), exudados (21,9%), sangre (12,5%), muestras respiratorias (12,5%), líquidos estériles (3,1%), catéteres (3,1%) y otras muestras (3,1%).

El rango de edad de los pacientes en los que se aisló *E. coli* osciló entre un mes y 97 años siendo la media de 60 años. En el caso de *K. pneumoniae* el rango fue de un día a 90 años y la media de 57 años.

Las características demográficas de los pacientes portadores de BLEE en el presente estudio son similares a los estudios previamente publicados⁶⁸. Es de destacar la mayor prevalencia de infecciones nosocomiales por *K. pneumoniae* que por *E. coli* (76% vs 42%; p=0,001). Alrededor del 75% de 50 estudios epidemiológicos realizados a escala mundial (donde se recogen datos de más de 3000 pacientes), han revelado que las infecciones nosocomiales causadas por organismos productores de BLEE son en su mayoría causadas por *K. pneumoniae*¹⁰⁹.

3.1.2 Relación clonal de las cepas

De los 124 aislamientos estudiados por la técnica de PFGE, en 10 (nueve *E. coli* y una *K. pneumoniae*) no se obtuvo ningún patrón de restricción con *Xba*I. Mediante el análisis por Rep-PCR se descartó la asociación clonal de estos nueve aislamientos de *E. coli* entre ellos y respecto a aquellos que por fecha y lugar de aislamiento y tipo de BLEE producida se consideró que pudieran estar epidemiológicamente relacionados.

El análisis comparativo de los patrones de restricción de DNA genómico obtenidos por PFGE mostró una gran diversidad clonal entre los aislamientos de *E. coli* (Figura 10). Sólo se observaron cinco *clusters* de dos cepas cada una con pulsotipos idénticos pertenecientes a cuatro hospitales distintos: dos en el HGTP (clones 1 y 2) y los otros tres en el HVH (clon 3), CPT (clon 4) y HB (clon 5).

En *K. pneumoniae* se observó una menor diversidad clonal, detectándose tres *clusters* que incluían 17 (51,5%) de los 32 aislamientos estudiados (Figura 11). El *cluster* 1 estaba constituido por cuatro cepas con pulsotipos idénticos procedentes del HVR. El *cluster* 2 incluía diez cepas, genéticamente relacionadas y subagrupadas en cuatro cepas idénticas del HSD (patrón 2), una cepa del HSP probablemente relacionada (diferencia de dos bandas) (patrón 2a), y otras cuatro iguales dos a dos procedentes del HC probablemente relacionadas entre ellas (diferencia de 1 banda) y con las cepas del patrón 2 (diferencia de 3 bandas) (patrón 2b y 2c). La cepa 1213 del HSP también se incluyó en el *cluster* 2, considerándose posiblemente relacionada con el patrón 2. Se detectó un tercer *cluster* (patrón 3) con cuatro cepas del CPT, tres idénticas y una cuarta probablemente relacionada (patrón 3a).

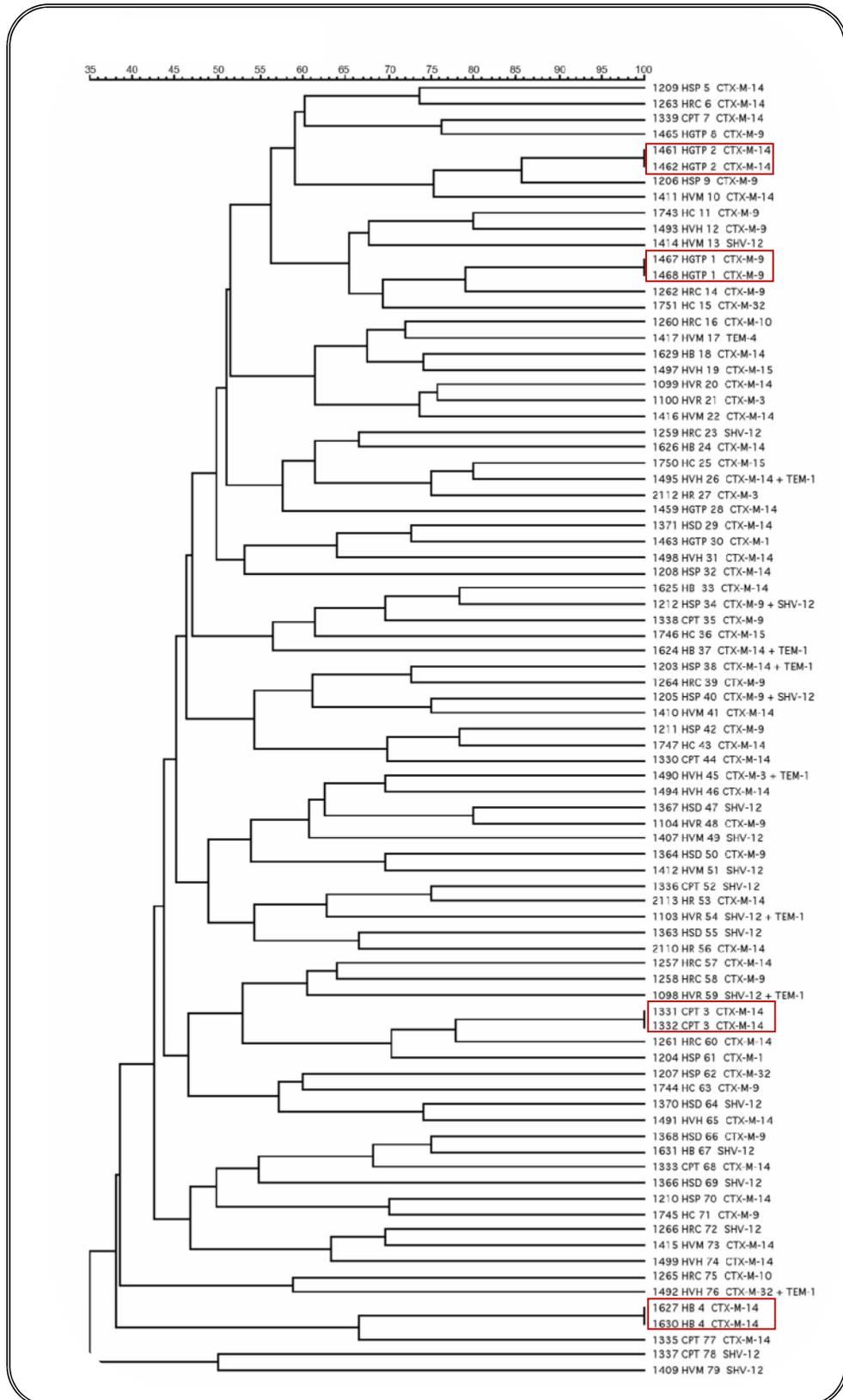


Figura 10. Dendrograma de las 83 cepas de *E. coli* con BLEE. Se detalla el nº de cepa, las iniciales del hospital de procedencia, el pulsotipo y finalmente la BLEE identificada.

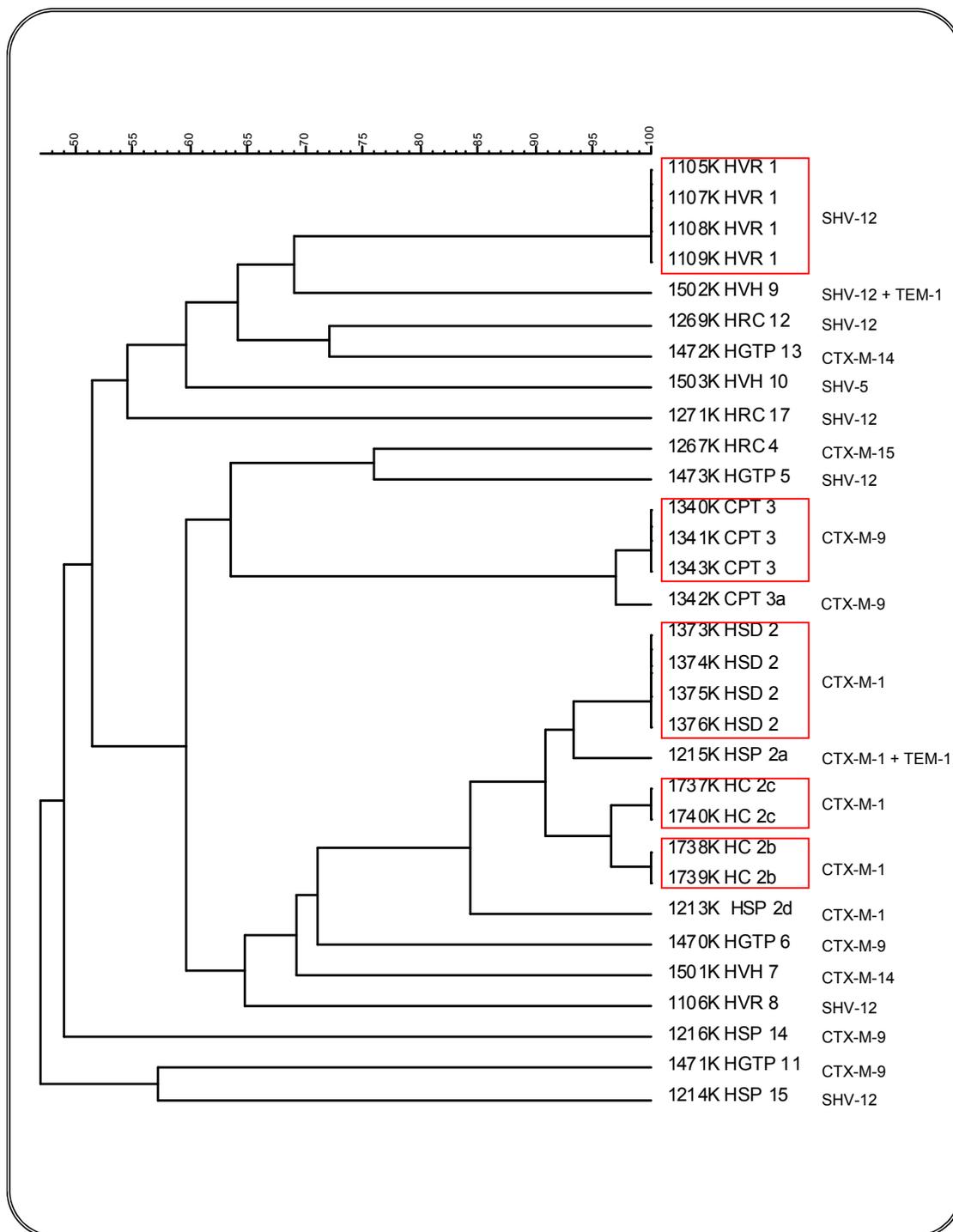


Figura 11. Dendrograma de las 31 cepas de *K. pneumoniae* con BLEE. Se detalla el nº de cepa, las iniciales del hospital de procedencia, el pulsotipo y finalmente la BLEE identificada.

3.1.3 Caracterización de BLEE

A continuación para la caracterización de las diferentes BLEE se realizó la técnica de isoelectroenfoque (IEF) para determinar el punto isoelectro (pI) de las betalactamasas presentes en cada aislado. En función de los pI obtenidos se realizaron PCR con iniciadores específicos para las familias de CTX-M, SHV y TEM y posteriormente se procedió a realizar la secuenciación del producto amplificado. Además, se realizó la técnica de conjugación en medio líquido empleándose las cepas *E. coli* HB101 resistente a kanamicina y rifampicina, *E. coli* BM694 y *E. coli* BM21; ambas resistentes a ácido nalidíxico.

De la caracterización genética de las BLEE se obtuvo que 72 (78,3%) de las 92 cepas de *E. coli* presentaron una BLEE tipo CTX-M; 42 (45,7%) CTX-M-14, 19 (20,6%) CTX-M-9, cuatro (4,3%) CTX-M-1, tres (3,3%) CTX-M-15, tres (3,3%) CTX-M-3, dos (2,2%) CTX-M-32 y una (1,1%) CTX-M-10. Veinte cepas (21,7%) presentaron SHV-12. Dos de estas cepas expresaron conjuntamente SHV-12 y CTX-M-9 (Tabla 5).

De las 32 cepas de *K. pneumoniae*, 21 (65,6%) presentaron una BLEE tipo CTX-M; 10 (31,3%) CTX-M-1, siete (21,9%) CTX-M-9, tres (9,4%) CTX-M-14, una (3,1%) CTX-M-15; 10 (31,3%) de tipo SHV, nueve (28,1%) SHV-12 y una (3,1%) SHV-5; y finalmente, una TEM-4 (3,1%) (Tabla 6).

TABLA 5. BLEE presentes en las cepas de *E. coli*

Centro ^a	nº cepas	CTX-M-1	CTX-M-3	CTX-M-9	CTX-M-10	CTX-M-14	CTX-M-15	CTX-M-32	SHV-12
CPT	10			1		6			3
HGTP	8	1		3		4			
HSP	10	2		2		4 ^b			2 ^c
HVH	9		1 ^d	2		4 ^b	1	1	
HC	8			4		1	2	1	
HB	8					7 ^b			1
HSD	9			2		3			4
HR	4					3			
HVR	6		1	1		1			3 ^e
HVM	10					5			5
HRC	10	1		3	1	3			2
	92	4(4,3%)	3(3,3%)	19(20,6%)	1(1,1%)	42(45,7%)	3(3,3%)	2(2,2%)	20(21,7%)

^a CPT: Corporació Hospitalaria Parc Taulí; HGTP: Hospital Germans Trias i Pujol; HSP: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau; HVH: Hospital Vall d'Hebron; HC: Hospital Clínic de Barcelona; HB: Hospital de Bellvitge; HSD: Hospital Son Dureta; HR: Hospital de la Ribera; HVR: Hospital Virgen del Rocío; HVM: Hospital Virgen de la Macarena; HRC: Hospital Universitario Ramón y Cajal.

^b presenta CTX-M-14 + TEM-1

^c las dos cepas presentan SHV-12 + CTX-M-9

^d presenta CTX-M-3 + TEM-1

^e dos cepas presentan SHV-12 + TEM-1

TABLA 6. BLEE, presentes en las cepas de *K. pneumoniae*.

Centro ^a	n° cepas	CTX-M-1	CTX-M-9	CTX-M-14	CTX-M-15	SHV-5	SHV-12	TEM-4
CPT	4		4					
HGTP	4		2	1			1	
HSP	4	2 ^b	1	1				
HVH	3			1		1	1 ^c	
IIC	4	4						
HB	0							
HSD	4	4						
HR	0							
HVR	5						5	
HVM	1							1
HRC	3				1		2	
	32	10(31,3%)	7(21,9%)	3(9,4%)	1(3,1%)	1(3,1%)	9(28,1%)	1(3,1)

^a CPT: Corporació Hospitalaria Parc Taulí; HGTP: Hospital Germans Trias i Pujol; HSP: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau; HVH: Hospital Vall d'Hebron; HC: Hospital Clínic de Barcelona; HB: Hospital de Bellvitge; HSD: Hospital Son Dureta; HR: Hospital de la Ribera; HVR: Hospital Virgen del Rocío; HVM: Hospital Virgen de la Macarena; HRC: Hospital Universitario Ramón y Cajal.

^b una cepa presenta CTX-M-1 + TEM-1

^c la cepa presenta SHV-12 + TEM-1

De los cinco *cluster* de dos aislamientos cada uno detectados en *E. coli*, tres de ellos son productores de CTX-M-14 y dos de CTX-M-9. En *K. pneumoniae*, el *cluster* 1 produce una SHV-12, el *cluster* 3 una CTX-M-9, y el *cluster* 2, que afecta a 3 hospitales distintos, una CTX-M-1 (Figura 11).

Mediante conjugación se observó la movilidad de los genes portadores de las BLEE. Se obtuvieron transconjugantes en el 72,6% de las cepas. La frecuencia de conjugación fue muy variable, entre 3×10^{-8} hasta $>10^{-1}$. Se obtuvieron transconjugantes en 70 de las 92 cepas de *E. coli* (76%) y en 20 de las 32 de *K. pneumoniae* (62,5%), no detectándose ninguna relación entre la frecuencia de conjugación y el tipo de BLEE implicada.

Es importante resaltar que los microorganismos no sólo desarrollan diferentes mecanismos de resistencia, sino que también son capaces de acumularlos, y en consecuencia, generan multirresistencias, lo cual significa un grave problema para la salud pública. Se ha demostrado la relación entre la administración de cefalosporinas de tercera generación y la adquisición de una cepa portadora de BLEE^{2, 47}, así como también se ha visto la relación que existe con la administración de otros antibióticos como quinolonas^{37, 140}, cotrimoxazol^{37, 74}, aminoglucósidos^{3, 74} y metronidazol⁷⁴.

Las betalactamasas tipo CTX-M con frecuencia se encuentran relacionadas con estructuras genéticas como los integrones, y concretamente los integrones de clase 1 asociados a *ISCR1*, capaces de integrar otros genes que confieren la resistencia a aminoglucósidos, cloranfenicol, sulfamidas y, en menor grado, a la rifampicina¹⁰.

Concretamente se han descrito diferentes integrones como el In60¹²⁵ que posee el gen *bla*_{CTX-M-9}, conjuntamente con el gen *aadA2*, que confiere resistencia a los aminoglucósidos, el gen *dfrA16*, que confiere resistencia al trimetoprim y *sul1* que confiere resistencia a las sulfamidas. También se han descrito los integrones InS21 e In35 que contienen el gen *bla*_{CTX-M-2}⁴⁶. Por otro lado, existen otros elementos genéticos como los transposones o las secuencias de inserción (IS) que pueden facilitar la movilidad de los genes. Por ejemplo, el gen *bla*_{CTX-M-14} presenta en el extremo 5' la *ISEφ1* y en el extremo 3' la *IS903*, secuencias también descritas alrededor de los genes de resistencia a aminoglucósidos o quinolonas⁴⁶. La caracterización de todos estos elementos en nuestras cepas es parte del segundo trabajo que se presenta en esta tesis y que se comentará posteriormente.

Así, en nuestro estudio, se ha observado que en función de la BLEE, las cepas mostraron una multiresistencia a tres o más antibióticos no betalactámicos, principalmente a tetraciclina (de 62,5 a 94,5%), ácido nalidíxico (de 69 a 89%) y cotrimoxazol (de 33,3 a 44,5%) (Tabla 7).

Tabla 7: Porcentaje de resistencias asociadas en las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* con distintas BLEE. Se ha incluido una cepa por clon.

	TET	NAL	CIP	SXT	CHL	TOB	KAN	GM
<i>Escherichia coli</i>								
SHV-12 (18)	94,5	89	27,8	44,5	83,4	11,1	22,2	16,7
CTX-M-1 (2)	1/2	1/2	0	1/2	0	1/2	0	1/2
CTX-M-3 (3)*	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	0	2/3	1/3
CTX-M-9 (16)	62,5	69	38	31	13	12,5	18,8	38
CTX-M-10 (2)*	2/2	2/2	0	0	0	0	0	0
CTX-M-14 (39)	73,7	79,5	79,5	33,3	51,3	25,6	13,2	10,3
CTX-M-15 (3)*	2/3	2/3	2/3	1/3	0	2/3	2/3	2/3
CTX-M-32 (2)*	2/2	1/2	1/2	2/2	2/2	0	0	0
CTX-M-9 + SHV-12 (2)*	2/2	2/2	0	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>								
SHV-12 (7)*	4/7	3/7	1/7	3/7	3/7	2/7	3/7	2/7
SHV-5 (1)*	1/1	0	0	1/1	0	0	0	0
CTX-M-1 (4)*	2/4	2/4	1/4	2/4	4/4	1/4	0	1/4
CTX-M-9 (4)*	2/4	2/4	0	3/4	3/4	3/4	0	2
CTX-M-14 (2)*	1/2	2/2	1/2	2/2	0	1/2	0	1/2
CTX-M-15 (1)*	0	1/1	1/1	0	0	0	0	0
TEM-4 (1)*	0	0	0	0	0	1/1	0	1/1

*En caso de tener menos de 10 cepas, los datos se presentan como número de cepas resistentes (numerador) y número de cepas estudiadas (denominador). CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; GM: gentamicina; KAN: kanamicina; NAL: ácido nalidíxico; SXT: cotrimoxazol; TET: tetraciclina; TOB: tobramicina.

El creciente aumento de las infecciones por BLEE es un problema mundial que conlleva el incremento de la resistencia a antimicrobianos de primera elección tanto en la comunidad como en los hospitales. Este aumento se atribuye, en general, al uso inadecuado de antimicrobianos y al intercambio de elementos genéticos de resistencia entre microorganismos^{53, 59, 139}.

La prevalencia de cepas con BLEE puede ser muy variable entre diferentes países, ciudades e incluso hospitales de una misma ciudad^{43, 77}. Además, las BLEE detectadas pueden variar de una institución a otra. Son varios los estudios previos al nuestro en los que se ha hecho el seguimiento de BLEE en hospitales españoles y en donde se evidencia esta distinta distribución e incidencia^{11, 18, 68, 124}; observándose que, si hace dos décadas la mayoría de BLEE provenían de *K. pneumoniae* y eran mayoritariamente enzimas de las familias SHV y TEM, actualmente este panorama ha cambiado constatándose que la mayoría de los aislamientos son portadores de BLEE tipo CTX-M, reconociéndose con mayor frecuencia en *E. coli* que en el resto de enterobacterias incluyendo *K. pneumoniae*^{7, 113}. Cabe remarcar también la aparición de un clon virulento de *E. coli* (O25:H4-ST131) productor de CTX-M-15 diseminado intercontinentalmente¹⁰¹ y que en España, además de haberse aislado en humanos, también se ha encontrado en granjas de aves pero produciendo CTX-M-9³². Así también, posteriormente a nuestro estudio, en el año 2006, se observó un incremento en el porcentaje de producción de BLEE en *E. coli* del 0,5% al 4,04% y en *K. pneumoniae* del 2,7% al 5,05% comparado con el estudio del año 2000⁴².

Los resultados de nuestro estudio muestran que entre las cepas de *E. coli* productoras de BLEE no existe un clon predominante. Se han encontrado

pequeños *clusters* formados por cepas que expresan mayoritariamente CTX-M-14. La caracterización de las BLEE mostró en *E. coli* un predominio de CTX-M-14 (45,7%), CTX-M-9 (20,6%) y SHV-12 (21,7%), aislándose también diversos tipos de CTX-M (CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-15 y CTX-M-32). Estos resultados concuerdan con estudios puntuales anteriores, donde ya se describe, por un lado, una prevalencia mayor de CTX-M-14 que de CTX-M-9, así como un incremento en la diversidad de enzimas tipo CTX-M^{11, 77, 88}, la sustitución de cepas portadoras de SHV-2 por cepas con SHV-12^{88, 121} o la disminución de cepas portadoras de BLEE tipo TEM.

El porcentaje de cepas de *E. coli* portadoras de BLEE tipo TEM en el año 2000 era de un 19%⁶⁸, mientras que en este estudio no se ha aislado ninguna cepa. Es de resaltar la baja incidencia de cepas con CTX-M-15, pues estas cepas se han descrito ampliamente en otros países europeos^{29, 77} y cuya diseminación se debe a clones del grupo filogenético B2 o D y a los complejos clonales ST131⁹ y ST405²⁹. En nuestro estudio sólo se detectaron 3 cepas de *E. coli* productores de CTX-M-15 que no están genéticamente relacionadas, y que ninguna pertenece a los ST antes citados, al contrario de lo descrito posteriormente en aislamientos nosocomiales y comunitarios de distintos centros sanitarios de Madrid entre Enero de 2004 y Agosto de 2005, donde se halló que el 83% (n=151) de las cepas estudiadas presentaban la CTX-M-15¹⁰⁸.

Se ha detectado una mayor homología genética entre los distintos aislamientos de *K. pneumoniae* productoras de BLEE que la observada en *E. coli*, con la presencia de pequeños *clusters* producidos por cepas portadoras de SHV-12, CTX-M-9 y

principalmente de CTX-M-1. Cabe destacar la diseminación clonal interhospitalaria de aislamientos de *K. pneumoniae* productores de CTX-M-1 detectada en dos centros de Barcelona (HSP, HC) y uno de Mallorca (HSD). En este último centro se había detectado previamente la existencia de un brote intrahospitalario de *K. pneumoniae* productora de CTX-M-1⁸⁵.

En *K. pneumoniae*, al igual que en *E. coli*, las BLEE tipo TEM han disminuido, detectándose tan sólo una cepa productora de TEM-4. De la familia SHV se encontraron las enzimas SHV-12 (28,1%) y SHV-5 (3,1%), no aislándose ninguna cepa con SHV-2. Nuestros resultados son similares a los descritos en algunos hospitales españoles^{67, 121}, pero difiere del estudio multicéntrico del 2000, donde el 58% de las cepas presentaban BLEE tipo TEM y un 29% tipo SHV, describiéndose cepas con SHV-2 y SHV-2a⁶⁸ (Figura 12). Si se selecciona una cepa por clon, se observa que la enzima predominante en *K. pneumoniae*, dentro de la familia de las CTX-M, es CTX-M-1 y CTX-M-9, ambas con un 15,6% cada una, seguida de CTX-M-14 con un 6,2%. A diferencia de lo descrito en el estudio multicéntrico del 2000, donde se destacó la presencia de cepas portadoras de CTX-M-10 (13%)⁶⁸ y que parece endémica en el área de Madrid^{18, 30}, en este trabajo se aisló sólo una cepa con esta enzima. En el presente estudio, también se evidencia la aparición de cepas de *E. coli* portadoras de dos BLEE (CTX-M-9 y SHV-12). Esta asociación ha sido documentada previamente, aunque no se detectó en el estudio multicéntrico del año 2000⁶⁷.

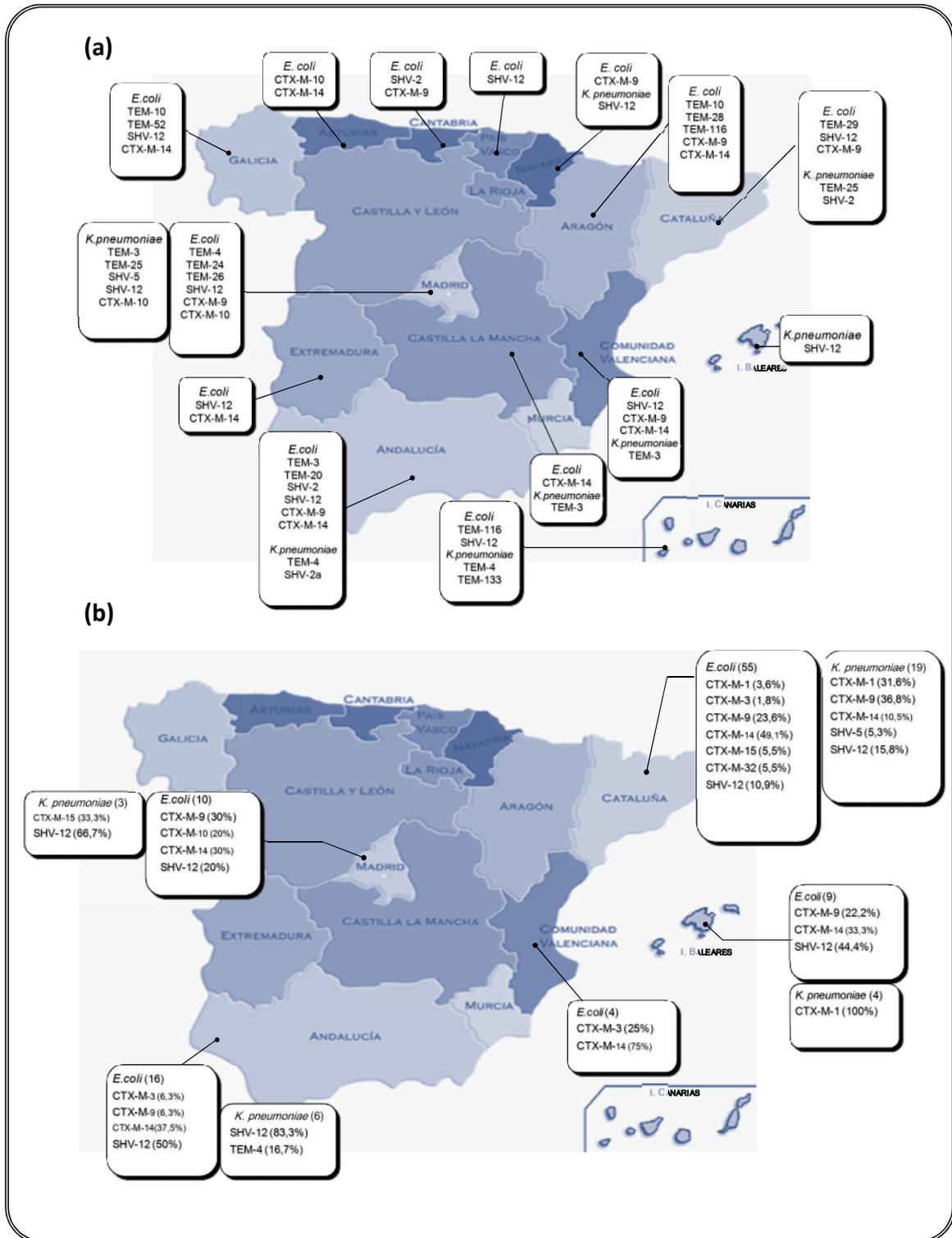


Figura 12. BLEE encontradas en diferentes comunidades autónomas en el año 2000 (a) y 2004 (b)

3.2 Caracterización de los plásmidos portadores de genes *bla*_{BLEE} y su correspondiente entorno genético (Artículo II).

Una vez identificadas las enzimas BLEE y determinado el patrón de resistencia a antibióticos no betalactámicos, se procedió a caracterizar los plásmidos que codificaban dichas betalactamasas y su entorno genético. Se seleccionaron 58 cepas representativas de las familias CTX-M (n=45: 14 CTX-M-9, 13 CTX-M-14, 7 CTX-M-1, 4 CTX-M-15, 3 CTX-M-32, 2 CTX-M-3 y 2 CTX-M-10) y SHV (n=15: 14 SHV-12 y 1 SHV-5) y sólo una cepa por clon. Dos cepas contenían CTX-M-9 y SHV-12 a la vez. De las 58 cepas, 24 eran salvajes (15 *E. coli* y 9 *K. pneumoniae*) y 34 transconjugantes (26 *E. coli* y 8 *K. pneumoniae*).

Se obtuvieron transconjugantes en 70 de las 92 cepas de *E. coli* (76,1%) y en 20 de las 32 de *K. pneumoniae* (62,5%) no detectándose ninguna relación entre el tipo de BLEE implicada y la frecuencia de conjugación; siendo la frecuencia muy variable, entre 3×10^{-8} hasta $>10^{-1}$. Los transconjugantes obtenidos constituyeron el 72,6% del total de las cepas estudiadas.

Los grupos de incompatibilidad de los plásmidos portadores de los genes *bla*_{BLEE} fueron determinados mediante la técnica PCR-*replicon typing* descrita por Carattoli *et al.*²⁰. El perfil plasmídico de las cepas salvajes y de las transconjugantes se determinó mediante electroforesis en campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE) utilizando el equipo CHEF (*Contour-clamped Homogeneous Electric Field*, BioRad) y empleando para la digestión del DNA total la endonucleasa *S1* (enzima que linealiza el DNA plasmídico). Los geles fueron transferidos por Southern blot y las membranas obtenidas fueron hibridadas con sondas específicas para los grupos HI2, HI1, I1- γ , X, L/M, N, FIA, FIB, FIC, W, Y, P, A/C, T, K, B/O, FrepB y FIIAs así como también

para los genes bla_{CTX-M} y bla_{SHV} . El marcaje de la sonda así como su detección se realizó usando el *kit* ECL (GE Healthcare Amersham ECLTM, Buckinghamshire, UK) mediante la técnica previamente descrita⁵¹.

Los plásmidos portadores de las enzimas CTX-M y SHV presentaron tamaños muy diversos comprendidos entre 40 y 340 Kb (Tabla 8) y su grupo de incompatibilidad se pudo determinar en un 94,8% de los casos. Tanto en *E. coli* como en *K. pneumoniae* se observó un variado número de grupos de incompatibilidad (IncHI2, IncI1, IncK, IncN, IncFII, IncFIB, IncFIA, Inc A/C e IncP) (Figura 14 y 15) de los plásmidos portadores de genes bla_{CTX-M} y bla_{SHV} , observándose la existencia de un elevado grado de correlación entre el grupo de incompatibilidad y la β -lactamasa codificada por el mismo.

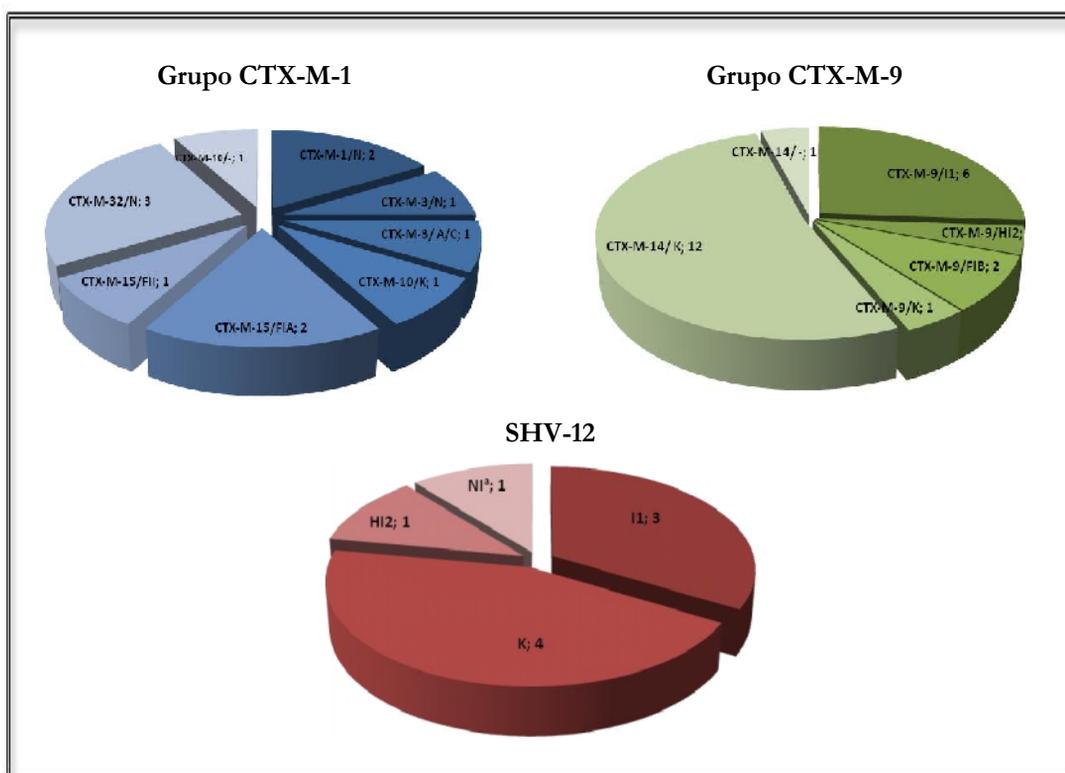


Figura 14. Distribución de los grupos de incompatibilidad de los plásmidos que codifican las BLEE estudiadas en *E. coli*. NI⁹ no pudo determinarse.

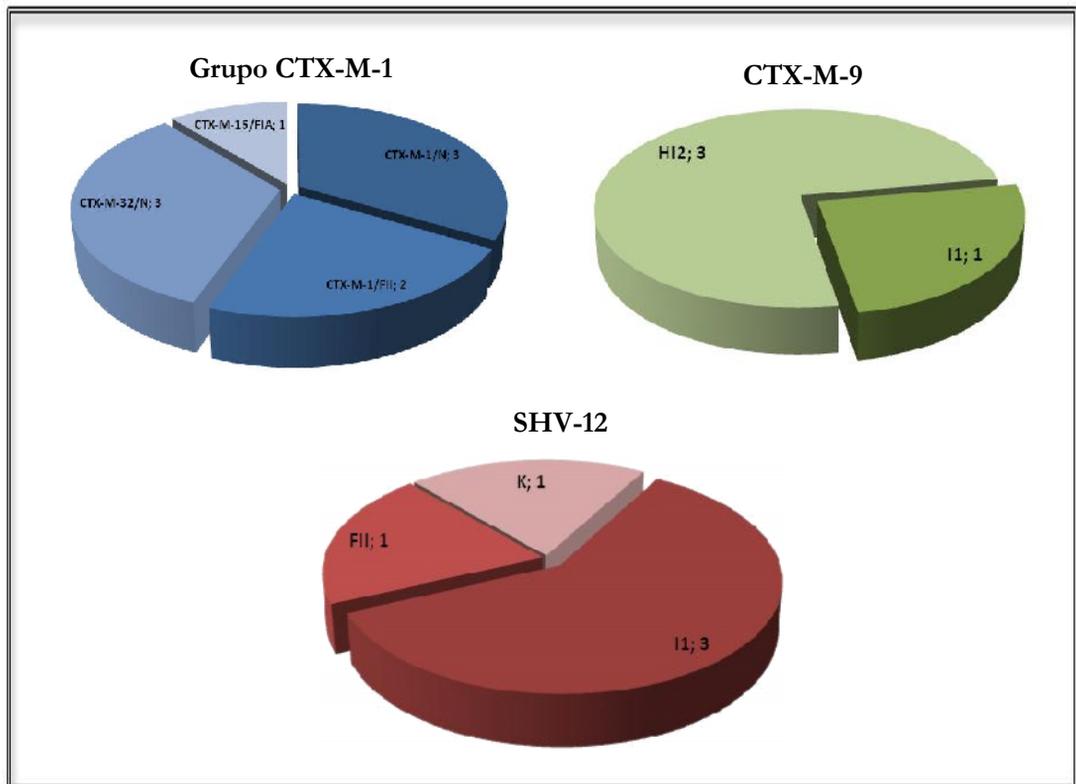


Figura 15. Distribución de los grupos de incompatibilidad de los plásmidos que codifican las BLEE estudiadas en *K. pneumoniae*.

La determinación del entorno genético de los genes bla_{BLEE} se realizó mediante la búsqueda de la presencia de secuencias de inserción previamente reportadas que se encuentran asociadas con el grupo de genes bla_{CTX-M} , como las secuencias *ISEcp1*, *IS903*, *IS26*, *ISCR1* y *orf1005*^{10, 98, 123}. Se realizaron las técnicas de PCR y secuenciación usando iniciadores previamente descritos^{51, 73, 107}. Adicionalmente se usaron iniciadores diseñados de acuerdo a las secuencias encontradas en el GeneBank con los números de acceso: AJ245670, para investigar la presencia del gen que codifica la proteína putativa RecF; y EF370423 y AY532647, para investigar la presencia del gen regulador DEOR; ambos genes relacionados con el grupo SHV.

Tabla 8. Caracterización de los grupos de incompatibilidad de los plásmidos portadores de los genes *bla*_{BLEE}.

<i>bla</i> _{BLEE}	Microorganismo	n ^a	Grupo de incompatibilidad	Tamaño aprox. del plásmido (kb)
<i>bla</i> _{CTX-M-1} (7)	<i>E. coli</i>	2	N	130
	<i>K. pneumoniae</i>	3	N	48
		2	FII	22
<i>bla</i> _{CTX-M-3} (2)	<i>E. coli</i>	1	N	50
		1	A/C	40
<i>bla</i> _{CTX-M-9} (14)	<i>E. coli</i>	6 ^b	I1	90-100
		1	HI2	340
		2	FIB	120
		1	K	90
	<i>K. pneumoniae</i>	1 ^c	I1	90
		3	HI2	200
<i>bla</i> _{CTX-M-10} (2)	<i>E. coli</i>	1	K	90
		1	- ^d	-
<i>bla</i> _{CTX-M-14} (13)	<i>E. coli</i>	12	K	85-90
		1	- ^d	-
<i>bla</i> _{CTX-M-15} (4)	<i>E. coli</i>	2	FIA	160
		1	FII	160
	<i>K. pneumoniae</i>	1	FIA	210
<i>bla</i> _{CTX-M-32} (3)	<i>E. coli</i>	3	N	60-185
<i>bla</i> _{SHV-12} (14)	<i>E. coli</i>	3	I1	120
		4	K	90
		1	HI2	340
		1	- ^d	-
	<i>K. pneumoniae</i>	3	I1	90-220
		1	FII	160
		1	K	55
<i>bla</i> _{SHV-5} (1)	<i>K. pneumoniae</i>	1	FII	160

^a número de cepas, ^b dos cepas presentaban IncI1 e IncP, ^c la cepa presentaba IncI1 e IncP, ^d no pudo determinarse.

3.2.1 Enzimas del grupo CTX-M-9

En los resultados obtenidos (Tabla 8) se observa que los 14 genes *bla*_{CTX-M-9} detectados en cepas pertenecientes a diferentes clones se localizaron en plásmidos de un variado número de grupos de incompatibilidad: IncI1 (n = 7; 50%), IncHI2 (n = 4; 28.5%), IncP (n = 3; 21.4%), IncF (repFIB) (n = 2; 14.3%) e IncK (n = 1; 7.1%), resaltando la presencia de dos replicones (IncI1 e IncP) en tres de los plásmidos portadores de esta enzima (2 en *E. coli* y 1 en *K. pneumoniae*). Cuatro plásmidos pertenecientes al grupo IncHI2 provenían de cepas aisladas en tres hospitales de Barcelona, no detectándose ningún otro plásmido portador de genes *bla*_{BLEE} perteneciente al grupo IncHI2. La asociación entre los plásmidos de los grupos IncI1 o IncHI2 con el gen *bla*_{CTX-M-9} observada en este estudio ha sido previamente descrita en España resaltando la persistencia de esta asociación^{52, 70, 97}.

El análisis del entorno genético reveló que los genes *bla*_{CTX-M-9} se encontraban asociados con el integron In60, observándose una gran diversidad dentro de este elemento coincidiendo con estudios españoles previos⁵¹. Las variaciones estuvieron principalmente relacionadas con deleciones dentro de la región *upstream* (ISCR1). En nuestro estudio, una cepa no contenía los genes ISCR1 y *orf1005* en las regiones *upstream* y *downstream* del gen *bla*_{CTX-M-9} respectivamente, cinco cepas no contenían el gen *orf1005* en la región *downstream* y ocho cepas contenían ambos genes (Figura 16).

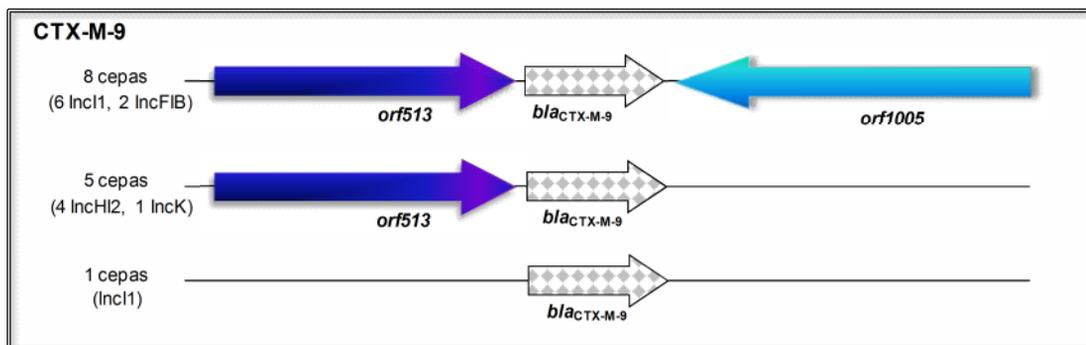


Figura 16. Representación del entorno genético del gen *bla*_{CTX-M-9} presente en 14 cepas.

3.2.2 Enzimas del grupo CTX-M-14

De las 13 cepas estudiadas, en 12, el gen *bla*_{CTX-M-14} se encontró en plásmidos del grupo IncK, quedando un caso por determinar. Esta asociación entre el gen *bla*_{CTX-M-14} y el grupo IncK ha sido previamente documentada en diferentes estudios^{70,97}.

En cuanto a su entorno genético, las regiones circundantes del gen *bla*_{CTX-M-14} fueron muy conservadas. La secuencia *ISEcp1* se encontró en la región *upstream* y la *IS903* *downstream* del gen, tal y como ha sido documentado previamente (Figura 17)⁷³ y que además se corresponde con el gen *bla*_{CTX-M-14a}⁹⁷.

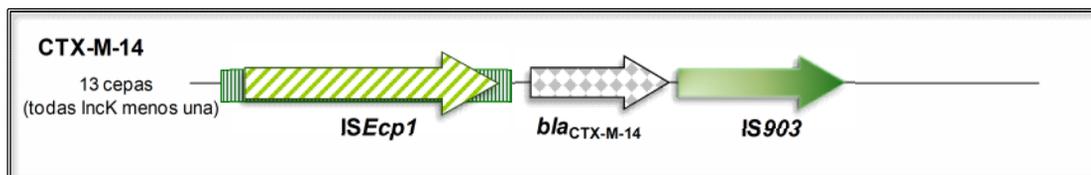


Figura 17. Representación del entorno genético del gen *bla*_{CTX-M-14a} presente en 13 cepas

3.2.3 Enzimas del grupo CTX-M-1

Cinco de los siete genes *bla*_{CTX-M-1} (Tabla 8) se localizaron en el plásmido del grupo IncN (71,4%) y los otros dos en el IncFII (28,6%). Los tres genes *bla*_{CTX-M-32} también se encontraron en plásmidos del grupo IncN. La mayoría de los plásmidos tanto de los que contenían los genes *bla*_{CTX-M-1} como *bla*_{CTX-M-32} pertenecían al grupo IncN lo cual coincide con un estudio realizado en Madrid¹⁰⁵. Esto hace énfasis en la relevancia de la evolución de los genes *bla*_{BLEE} dentro de entornos genéticos específicos, como ha sido sugerido para los genes *bla*_{CTX-M-9} y *bla*_{CTX-M-14}⁹⁷.

En cuanto a sus entornos genéticos, la región 3' de la secuencia de inserción *ISEφ1* truncada por la IS26, se encontró a 80bp de la región upstream en los 7 genes *bla*_{CTX-M-1} (Figura 18). La secuencia IS26 estuvo presente en estas siete cepas en la misma posición (en el nucleótido 214 a partir del final de la *ISEφ1*), observándose en cinco de ellas, una duplicación del inicio de la transposasa IS26 de 74bp. Además en estas cinco cepas la IS26 estuvo precedida por dos genes (*invA* y *orf10*) mostrando un 100% de homología con aquellas encontradas en cepas de *Comamonas acidovorans* (AB063332).

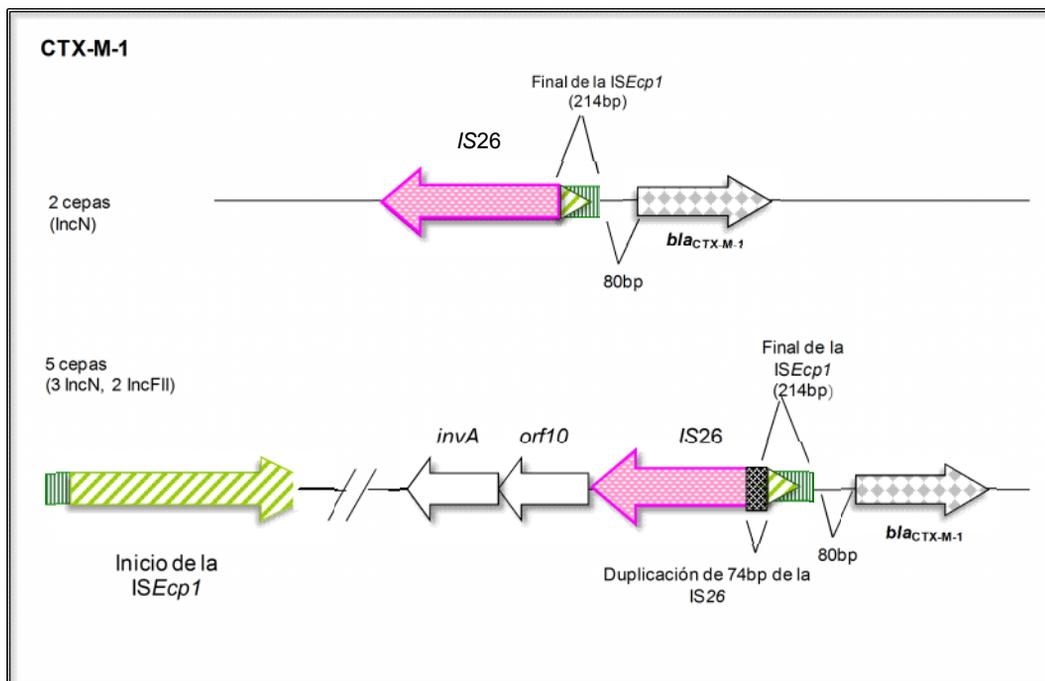


Figura 18. Representación del entorno genético del gen *bla*_{CTX-M-1} presente en 7 cepas. Estas nuevas estructuras fueron depositadas en el GenBank bajo los nº de acceso FJ235692 y FJ235693.

De manera similar a los genes *bla*_{CTX-M-1} el entorno de los tres genes *bla*_{CTX-M-32} mostraron la secuencia *ISEcp1* a 80bp de la región *upstream* (con una secuencia nucleotídica idéntica), pero truncada por la secuencia IS5 en lugar de la *IS26*, y en diferente posición (en el nucleótido 152 desde el final de la *ISEcp1*) (Figura 19).

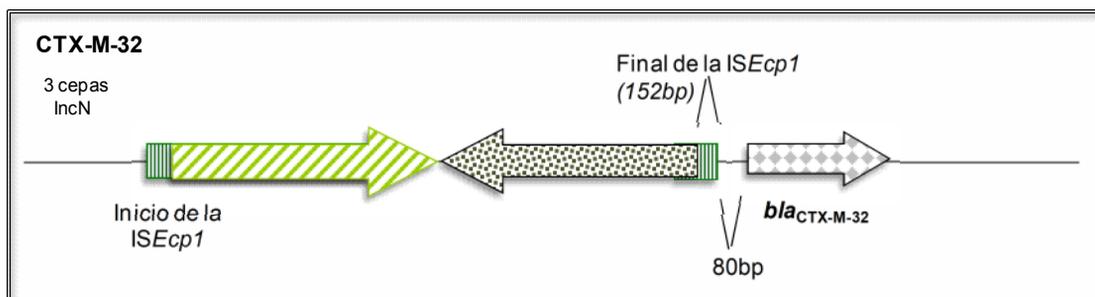


Figura 19. Representación del entorno genético del gen *bla*_{CTX-M-32} presente en 3 cepas.

En relación a los genes $bla_{CTX-M-3}$ ($n = 2$), uno estuvo localizado en un plásmido del grupo IncN, a 48bp de la región *downstream* de la $ISEcp1$ y truncado por la IS26, de manera similar a los entornos de dos genes $bla_{CTX-M-1}$. En cuanto al otro, estuvo localizado en un plásmido del grupo IncA/C, a 45bp *downstream* de la $ISEcp1$ (Figura 20).

Los plásmidos del grupo IncA/C parecen estar ampliamente diseminados, han sido detectados en cepas productoras de CTX-M-2 o CMY aisladas en diferentes países europeos y/o americanos¹⁰⁵.

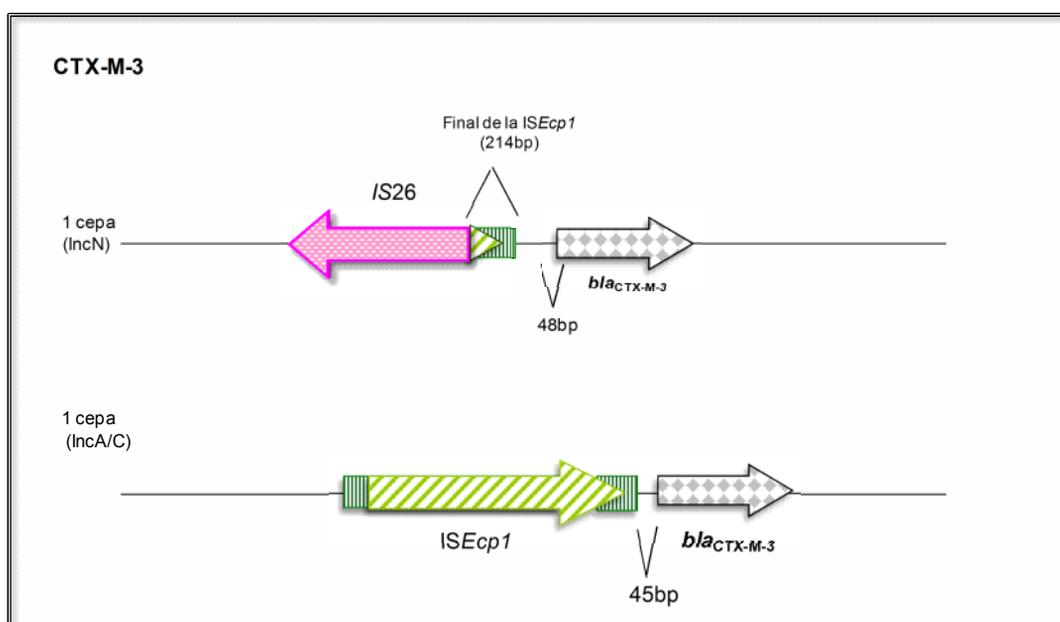


Figura 20. Representación del entorno genético del gen $bla_{CTX-M-3}$. La primera corresponde a una nueva estructura depositada en el Genebank con el n° de acceso FJ235691

Tres genes $bla_{CTX-M-15}$ se hallaron en plásmidos del grupo IncF (repFIA) y uno en el grupo IncFII. Diferentes estudios han señalado que la diseminación pandémica de cepas productoras de CTX-M-15 está ligada a una cepa de *E.coli* perteneciente al clon

internacional O25b-ST131 B2^{9, 41, 101} y/o un plásmido FII epidémico, aunque la asociación con plásmidos del grupo IncFI ha sido descrita^{29, 58, 70, 105}.

Cabe remarcar que los tres *E. coli* portadores del gen *bla*_{CTX-M-15} no estuvieron clonalmente relacionados. Con respecto al entorno genético del gen *bla*_{CTX-M-15} el límite derecho de la *ISEcp1* estuvo localizado a 48bp de la región *upstream* del gen en todos los casos, como ha sido previamente descrito en cepas procedentes de España, Francia, India y Turquía^{23, 29, 73, 105}. Una cepa tuvo la *ISEcp1* truncada por la IS26 en el nucleótido 24 a partir del final de la *ISEcp1* (Figura 21).

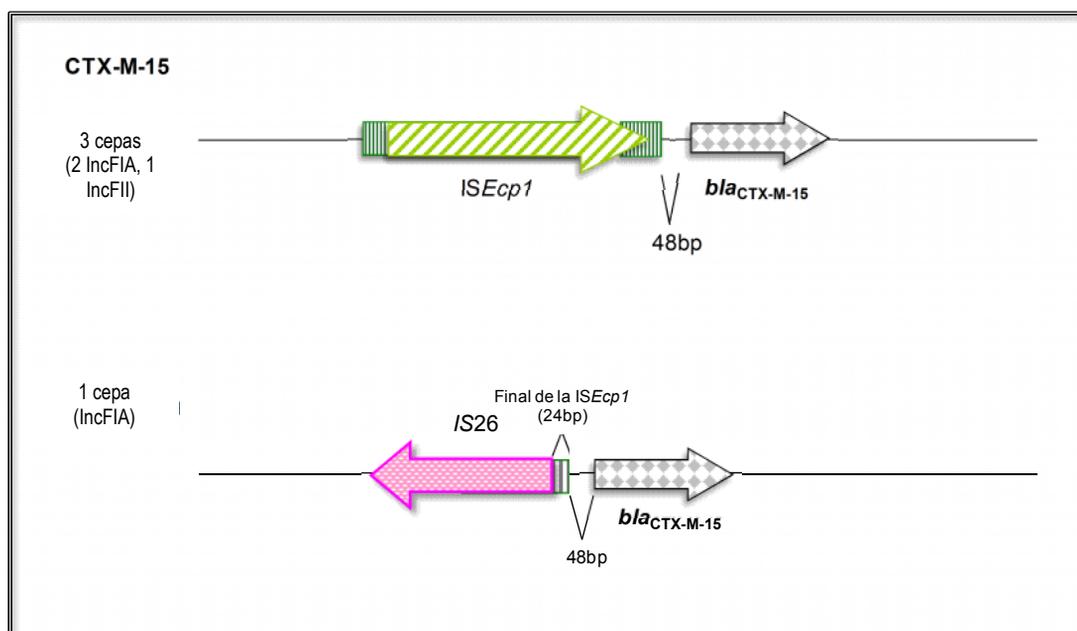


Figura 21. Representación del entorno genético del gen *bla*_{CTX-M-15} presente en 4 cepas.

Así, la *ISEcp1* se encontró siempre en la región *upstream* del gen *bla*_{CTX-M} que codifica las enzimas CTX-M-1 *like* (*bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-32}) y está fuertemente implicada en la movilización de este gen de resistencia a antibióticos⁷³.

Con respecto a los dos genes $bla_{CTX-M-10}$, uno estuvo localizado en el plásmido del grupo IncK, pero no fue posible determinar el grupo de incompatibilidad del otro. En el entorno genético de ambos genes, se halló en la región *upstream* del gen, una DNA invertasa relacionada con fagos (Figura 22) tal y como se ha descrito previamente¹⁰⁷. Esto sugiere que la movilización del gen $bla_{CTX-M-10}$ puede haber estado mediada por transducción.

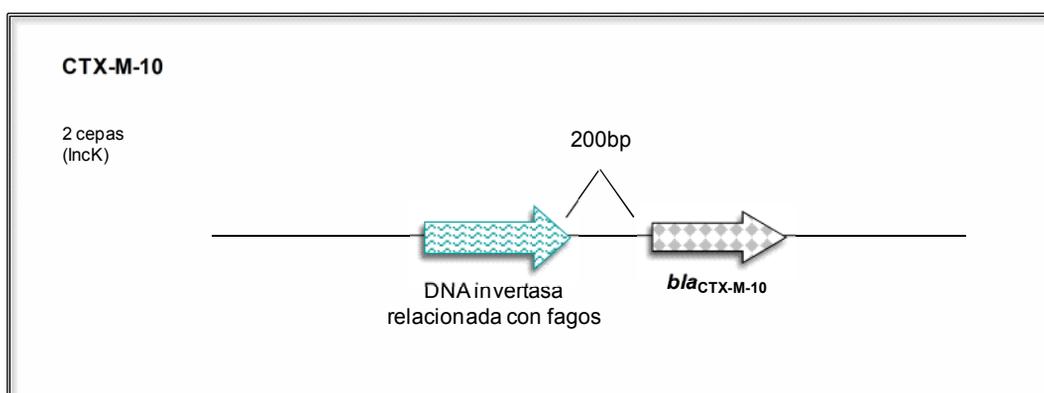


Figura 22. Representación del entorno genético del gen $bla_{CTX-M-10}$ presente en dos cepas.

3.2.4 Enzimas del grupo SHV

Doce de los 14 genes bla_{SHV-12} se localizaron en plásmidos del grupo IncI1 (n = 6; 42,9%), IncK (n = 5; 35,7%) e IncFII (n = 1; 7,1%) (Tabla 8). Las dos cepas restantes eran portadoras de los genes $bla_{CTX-M-9}$ y bla_{SHV-12} , en una de ellas ambos genes se localizaron en el plásmido del grupo IncHI2 (n = 1, 7,1%) mientras que en la otra no fue posible determinar el grupo de incompatibilidad. Estos resultados concuerdan con otro estudio que relaciona el gen bla_{SHV} con plásmidos de los grupos IncFII, IncI1 e IncA/C²¹.

En lo referente al entorno genético, la IS26 se encontró a 73 bp de la región *upstream* del gen bla_{SHV-12} en todos los casos. También se encontró en todas excepto en dos casos, el regulador de transcripción DEOR (GenBank EF370423) a 21 bp de la región *downstream* del gen bla_{SHV-12} (Figura 23).

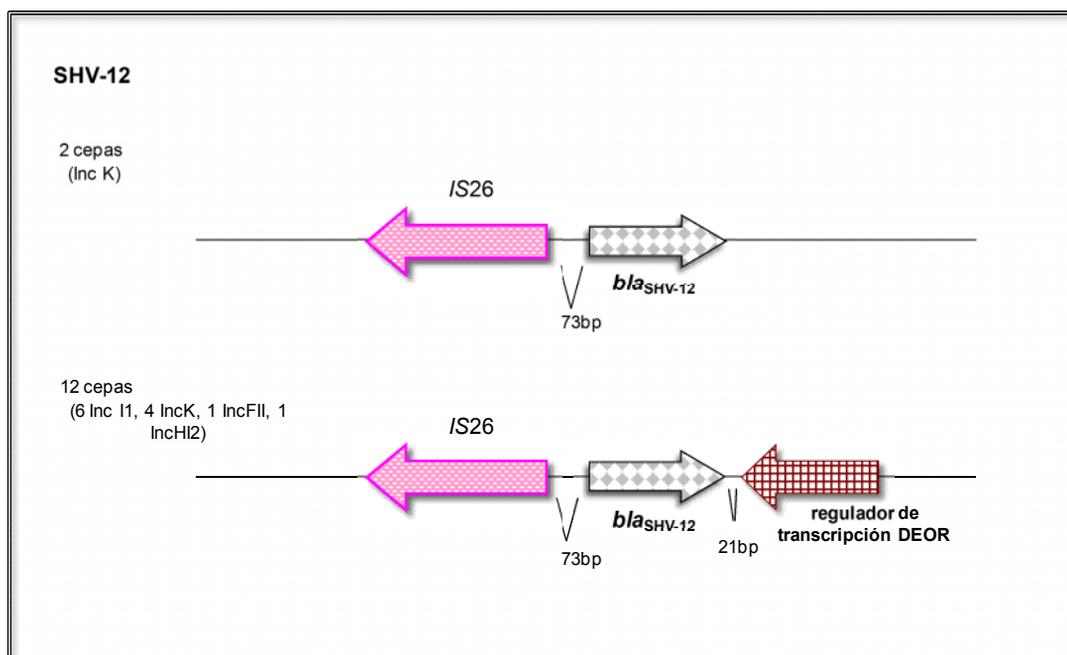


Figura 23. Representación del entorno genético del gen bla_{SHV-12} presente en 14 cepas.

El gen bla_{SHV-5} se localizó en el plásmido del grupo Inc FII y en su entorno genético se encontró la proteína putativa RecF (GenBank AY532647) en la región *upstream* del gen, y en la región *downstream* se halló el regulador de transcripción DEOR (GenBank EF370423) (Figura 24).

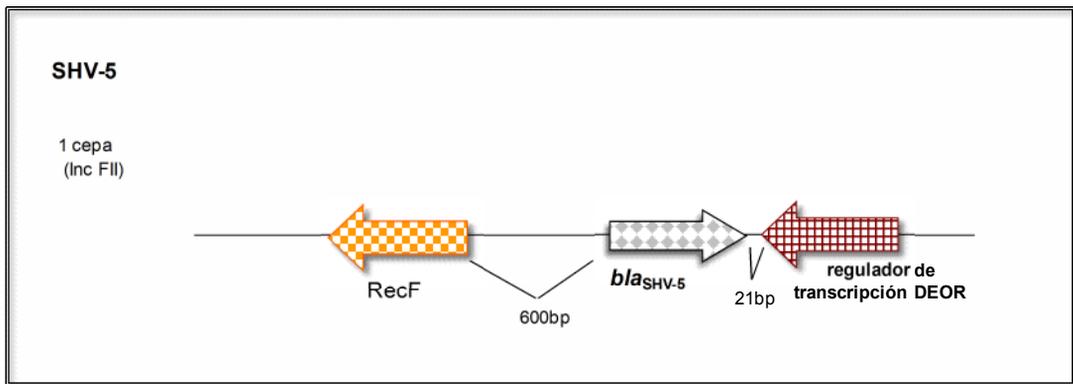


Figura 24. Representación del entorno genético del gen *bla*_{SHV-5} presente en 1 cepa.

3.3 Estructura Poblacional de cepas de *E. coli* productoras de BLEE (Artículo III)

Una vez estudiados los entornos genéticos y la localización plasmídica de las betalactamasas, el Centro Nacional de Microbiología procedió a estudiar los grupos filogenéticos y las secuencias tipo mediante *Multi Locus Sequence Typing* de las 91 cepas de *E. coli* (no se pudo secuenciar una cepa), determinando además la posible asociación entre los diferentes ST y las BLEE.

Como resultados se obtuvo que 37 cepas (40,2%) pertenecieron al grupo filogenético A, 26 (28,3%) al grupo B1, 13 (14,1%) al grupo B2 y 16 (17,4%) al grupo D.

Los estudios de MLST mostraron una gran diversidad de ST. Se identificaron 56 STs que se agruparon en 15 complejos ST, considerando las restantes 23 como *singletons*. El ST131 (ocho cepas) y ST167 (cinco cepas) fueron los más prevalentes del grupo estudiado. Los complejos ST10 (13 cepas; 14,3%) y ST23 (10 cepas; 11%) fueron los más comunes (Tabla 9).

Se observó una fuerte asociación entre los complejos ST10 y ST23 y el grupo filogenético A. Además de los ocho ST131, siete pertenecieron al grupo filogenético virulento B2.

Otro dato de interés que se observó fue que las cepas de *E. coli* pertenecientes a los ST o complejos ST mas prevalentes eran capaces de llevar prácticamente todas las BLEE detectadas en el estudio. El *E. coli* ST131 fue portador del mayor número de BLEE (CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-10, CTX-M-14, CTX-M- 15 y SHV-12), seguido del complejo ST10 (CTX-M-14, SHV-12, CTX-M-9, CTX-M-15 y CTX-M-32).

Con posterioridad a este trabajo, se ha observado una amplia difusión a nivel mundial del *E. coli* ST131/B2 asociado a la betalactamasa CTX-M-15, el cual ha sido objeto de muchas investigaciones^{9, 29, 41, 101, 108} llegando a considerársele epidémico. En el presente

trabajo, de las tres cepas de *E. coli* portadoras de CTX-M-15, sólo una correspondió al ST131/B2. Las otras dos correspondieron a los ST167/A y ST653/B2. Además, el ST131 no sólo estuvo asociado a la betalactamasa CTX-M-15, sino también, como acabamos de mencionar, a las BLEE CTX-M-9, CTX-M-10, CTX-M-14, SHV-12 y CTX-M-1. Esto concuerda con un estudio en el que el ST131 se asoció con genes *bla* del grupo CTX-M-2 y genes *bla*_{CTX-M-14}¹³⁰. En ese mismo estudio el ST38 estuvo asociado con la CTX-M-9 a diferencia de lo hallado en el nuestro en el que está asociado con la CTX-M-14.

Tabla 9: Distribución de los ST y los grupos filogenéticos de 91 cepas de *Escherichia coli* portadoras de BLEE relacionados según su betalactamasa.

BLEE (n)	ST complex (n)	ST ^a (grupo filogenético)	
CTX-M-14 (41)	ST23 (6)	23 ² (A); 88 ¹ (A); 410 ¹ (A); 612 ¹ (A); 650 ¹ (A)	
	ST10 (4)	617 ² (A); 48 ¹ (A); 167 ¹ (A)	
	ST31 (3)	130 ¹ (D); 393 ¹ (D); 613 ¹ (D)	
	ST538 (3)	538 ² (D); 620 ¹ (B2)	
	ST46 (2)	615 ² (A)	
	ST101 (2)	101 ¹ (B1); 619 ¹ (B1)	
	ST155 (2)	616 ¹ (B1); 621 ¹ (B1)	
	ST156 (2)	348 ¹ (B1); 611 ¹ (B1)	
	ST38 (1)	38 ¹ (D)	
	ST69 (1)	69 ¹ (D)	
	ST354 (1)	623 ¹ (B2)	
	SHV-12 (18)	Singletons (13)	359 ³ (B1); 224 ² (B1); 131 ¹ (B2); 196 ¹ (B1); 610 ¹ (B1); 614 ¹ (A); 622 ¹ (B2); 624 ¹ (D); 625 ¹ (B2); 649 ¹ (B1)
		ST10 (4)	167 ² (A); 10 ¹ (A); 227 ¹ (A)
ST23 (2)		23 ² (A)	
ST168 (2)		93 ² (A)	
ST101 (1)		604 ¹ (B1)	
ST350 (1)		57 ¹ (D)	
ST354 (1)		354 ¹ (D)	
Singletons (7)		117 ¹ (D); 127 ¹ (D); 131 ¹ (B2); 224 ¹ (B1); 297 ¹ (B1); 605 ¹ (A); 608 ¹ (A)	
CTX-M-9 (17)		ST446 (4)	602 ⁴ (B1)
		ST10 (2)	193 ² (A)
		ST59 (1)	59 ¹ (D)
		ST156 (1)	156 ¹ (B1)
		Singletons (9)	117 ² (D); 131 ² (B2, D); 359 ¹ (B1); 401 ¹ (A); 600 ¹ (B1); 606 ¹ (B1); 607 ¹ (A)
Otras BLEE (15) ^b	ST10 (3)	167 ² (A); 10 ¹ (A)	
	ST23 (2)	88 ¹ (A); 410 ¹ (A)	
	ST46 (1)	609 ¹ (A)	
	Singletons (9)	131 ⁴ (B2); 401 ² (A); 540 ¹ (A); 603 ¹ (B1); 653 ¹ (B2)	

^a Número de cepas en superíndice.

^b Dos CTX-M-1, tres CTX-M-3, dos CTX-M-10, tres CTX-M-15, tres CTX-M-32 y dos CTX-M-9 + SHV-12.

4. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

“La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles, no puede ni podrá nunca explicarlo todo. Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable. Pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que se eleven, tendrán siempre delante un infinito mundo de misterio”

Gregorio Marañón.

4. CONCLUSIONES

1. En las infecciones por *K. pneumoniae* eran más frecuentes las infecciones nosocomiales que las adquiridas en la comunidad. Este comportamiento era claramente distinto al observado en *E. coli* aunque no se pueden descartar posibles sesgos al recoger los datos.
2. Se observó un incremento en la diversidad de BLEE en *E. coli* y *K. pneumoniae* con respecto a la observada en el año 2000.
3. Se observó un incremento en la diversidad de enzimas tipo CTX-M, sustitución de cepas portadoras de SHV-2 por cepas con SHV-12 y disminución de cepas portadoras de BLEE tipo TEM con respecto al estudio del año 2000.
4. Las enzimas predominantes en *E. coli* fueron la CTX-M-14 con un 45,7%; la CTX-M-9 con un 20,6% y la SHV-12 con un 21,7%.
5. Las enzimas predominantes en *K. pneumoniae* fueron la CTX-M-1 con un 31,3% y la SHV-12 con un 28,1%.
6. Se evidenció la aparición de cepas de *E. coli* portadoras de dos BLEE (CTX-M-9 y SHV-12).
7. Se observó una gran diversidad clonal en *E. coli* y menor en *K. pneumoniae*.
8. Se halló la presencia de pequeños *clusters* producidos por cepas portadoras principalmente de CTX-M-1, CTX-M-9 y SHV-12, destacándose la diseminación clonal interhospitalaria de aislamientos de *K. pneumoniae* productores de CTX-M-1 detectada en dos centros de Barcelona (HSP, HC) y uno de Mallorca (HSD).

9. Las BLEE detectadas se encontraban en plásmidos conjugativos en el 72,6% de las cepas estudiadas. La frecuencia de conjugación fue muy variable, entre 3×10^{-8} hasta $>10^{-1}$.
10. No se detectó ninguna relación entre la frecuencia de conjugación y el tipo de BLEE implicada.
11. En función de la BLEE, las cepas mostraron multiresistencia a tres o más antibióticos no β -lactámicos, en *E. coli* en un 64,4% y en *K. pneumoniae* en un 60%.
12. Los genes *bla*_{CTX-M-9} y *bla*_{SHV-12} se encuentran codificados en plásmidos que pertenecen a grupos de incompatibilidad muy diversos (Inc I1, HI2, FIB, K y FII).
13. A pesar de observarse gran variedad en los entornos genéticos, algunos genes *bla* se relacionaron de manera común con determinados elementos móviles: *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{SHV-12} con el elemento IS26; y *bla*_{CTX-M-14} y *bla*_{CTX-M-32} con ISEcp1.
14. Se observó una gran diversidad de tipos de MLST en las cepas de *E. coli* siendo los más frecuentes los complejos ST23 y ST10 y el singleton ST131.
15. En el año 2004 aún no se evidenció la difusión de la clona de *E. coli* O25 ST131/B2 portadora de CTX-M-15, aislándose en este estudio sólo tres cepas portadoras de CTX-M-15 pertenecientes a los ST131/B2, ST167/A y ST653/B2.

CONCLUSIONS

1. *K. pneumoniae* infections were more frequently associated to nosocomial infections than to community-acquired infections. This behavior was clearly different from that observed in *E. coli* but possible biases in data collecting can not be ruled out.
2. The diversity of ESBL in *E. coli* and *K. pneumoniae* increased with respect to a previous epidemiological study.
3. The diversity of CTX-M type enzymes increased. Moreover, a replacement of SHV-2 for SHV-12-producing strains and decrease of TEM ESBL-producing strains was found with respect to studies performed in 2000.
4. The predominant enzymes in *E. coli* were CTX-M-14, 45.7%; CTX-M-9, 20.6% and SHV-12, 21.7%.
5. Predominant enzymes in *K. pneumoniae* were the CTX-M-1 with 31.3% and SHV-12 with 28.1%.
6. The emergence of *E. coli* carrying two ESBL (CTX-M-9 and SHV-12) was detected..
7. There was high clonal diversity in *E. coli* and less diversity in *K. pneumoniae*.
8. Small clusters, mainly produced by CTX-M-1, CTX-M-9 and SHV-12-carrying strains, were detected, highlighting the interhospital clonal spread of isolates of CTX-M-1-producing *K. pneumoniae* detected in two centers in Barcelona (HSP, HC) and one in Mallorca (HSD).

9. ESBL were detected on conjugative plasmids in 72.6% of the strains. The frequency of conjugation varied between 3×10^{-8} to $> 10^{-1}$.
10. No relationship was found between the frequency of conjugation and type of ESBL.
11. Multiresistance to three or more non-betalactamic antibiotics was observed in *E.coli*, 64.4%, and *K. pneumoniae*, 60%.
12. The *bla*_{CTX-M-9} and *bla*_{SHV-12} genes were encoded by plasmids belonging to different incompatibility groups (Inc I1, HI2, FIB, and FII K).
13. Despite the wide variety of the genetic environments, some *bla* genes were commonly linked with certain moving elements: *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{SHV-12} with the IS26 element and *bla*_{CTX-M-14} and *bla*_{CTX-M-32} with *ISEcp1*.
14. There was a great diversity of MLST types in *E. coli* strains, with ST131 being the most frequent.
15. In 2004, the spread of ST131/B2 CTX-M-15-producing *E. coli* strains had not yet been identified, and in this study the three strains carrying CTX-M-15 belonged to the ST131/B2, ST167/A and ST653/B2.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ambler, R. The structure of betalactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980; **289**: 321-31.
2. Ariffin, H., P. Navaratnam, M. Mohamed, A. Arasu, W. Abdullah y C. Lee. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection in children with febrile neutropenia. *Int J Infect Dis.* 2000; **4**: 21-25.
3. Asensio, A., A. Oliver, P. González-Diego, F. Baquero, J. Pérez-Díaz y P. Ros. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clin Infect Dis.* 2000; **30**: 55-60.
4. Balis, E., A. Vatopoulus, M. Kanelopoulou, E. Mainas, G. Hatzoudis, V. Kontogianni, H. Malamou, S. Kitsou-Kiriakopoulou y V. Kalapothaki. Indications of *in vivo* transfer of an epidemic R plasmid from *Salmonella enteritidis* to *Escherichia coli* of the normal human gut flora. *J Clin Microbiol.* 1996; **34**: 977-79.
5. Barroso, H., A. Freitas-Vieira y A. Duarte. Molecular characterization of a ceftazidime-resistant *Morganella morganii* isolate producing a TEM-10 betalactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; **43**: 434-5.
6. Bauernfeind, A., I. Stemplinger, R. Jungwirth, P. Mangold, S. Amann, E. Akalin, O. Ang, C. Bal y J. Casellas. Characterization of β -lactamase gene *bla*_{PER-2}, which encodes an extended-spectrum class A β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; **40**: 616-20.
7. Ben-Ami, R., M. Schwaber, S. Navon-Venezia, D. Schwartz, M. Giladi, I. Chmelnitsky, A. Leavitt y Y. Carmeli. Influx of extended-spectrum β -Lactamase-producing *Enterobacteriaceae* into the hospital. *Clin Infect Dis.* 2006; **42**: 925-34.
8. Bergan, T., J. Bruun, A. Digranes, E. Lingaas, K. Melby y J. Sander. Susceptibility testing of bacteria and fungi. *Scand J Infect Dis.* 1997; **103**: 1-36.

9. Blanco, M., M. Alonso, M. Nicolas-Chanoine, G. Dahbi, A. Mora, J. Blanco, C. López, P. Cortés, M. Llagostera, V. Leflon-Guibout, B. Puentes, R. Mamani, A. Herrera, M. Coira, F. García-Garrote, J. Pita y J. Blanco. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in Lugo (Spain): Dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.* 2009; **63**: 1135-41.
10. Bonnet, R. Growing group of extended spectrum β -lactamases: The CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; **48**: 1-14.
11. Bou, G., M. Cartelle, M. Tomas, D. Canle, F. Molina, R. Moure, J. Eiros y A. Guerrero. Identification and broad dissemination of the CTX-M-14 β -Lactamase in different *Escherichia coli* strains in the Northwest area of Spain. *J Clin Microbiol.* 2002; **40**: 4030-6.
12. Bradford, P. Extended spectrum β -lactamases in the 21st Century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001; **14**: 933-51. <http://cmr.asm.org/cgi/content/short/14/4/933>
13. Bradford, P., C. Urban, A. Jaiswal, N. Mariano, B. Rasmussen, S. Projan, J. Rahal y K. Bush. SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; **39**: 899-905.
14. Bush, K. y G. Jacoby. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; **54**: 969-76.
15. Bush, K., G. Jacoby y A. Medeiros. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; **39**: 1211-33.
16. Cantón, R. Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; **28**: 375-85.

17. Cantón, R. y T. Coque. The CTX-M betalactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006; **9**: 466-75.
18. Cantón, R., A. Oliver, M. Coque, M. Varela, J. Pérez-Díaz y F. Baquero. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol.* 2002; **40**: 1237-43.
19. Carattoli, A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; **53**: 2227-38.
20. Carattoli, A., A. Bertini, L. Villa, V. Falbo, K. Hopkins y E. Threlfall. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* 2005; **63**: 219-28.
21. Carattoli, A., V. Miriagou, A. Bertini, A. Loli, C. Colinon, L. Villa, J. Whichard y G. Rossolini. Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer β -lactams. *Emerg Infect Dis.* 2006; **12**: 1145-8.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth informational supplement. M100-S20. *Wayne, PA.* 2010; **30**.
23. Coelho, A., J. González-López, E. Miró, C. Alonso-Tarrés, B. Mirelis, M. Larrosa, R. Bartolomé, A. Andreu, F. Navarro, J. Johnson y G. Prats. Characterisation of the CTX-M-15-encoding gene in *Klebsiella pneumoniae* strains from the Barcelona metropolitan area: Plasmid diversity and chromosomal integration. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; **36**: 73-78.
24. Cohen, J., C. Dierikx, N. Al Naimi, A. Karczmarek, A. Van Hoek, P. Vos, A. Fluit, J. Scharringa, B. Duim, D. Mervius y M. Leverstein-Van Hall. Rapid detection of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* using ligation-mediated amplification with microarray analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; **65**: 1377-781.
25. Colardyn, F. Appropriate and timely empirical antimicrobial treatment of ICU infections - a role for carbapenems. *Acta Clin Belg.* 2005; **60**: 51-62.

26. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Technical recommendations for *in vitro* susceptibility testing. *Edition de Janvier 2010*. 2010. Disponible en: [http:// www.sfm.asso.fr/publi/general.php?pa=1](http://www.sfm.asso.fr/publi/general.php?pa=1)
27. Commissie Richtlijnen Gevoeligsbepalingen. Interpretatie van gevoeligheidsonderzoek en gevoeligheidscriteria voor antibacteriële middelen in Nederland. *Nederlands Tijdschrift Med Microbiol* 2000; **3**: 79-81.
28. Coque, M., F. Baquero y R. Cantón. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill*. 2008; **13**: 1-11.
29. Coque, M., A. Novais, A. Carattoli, L. Poirel, J. Pitout, L. Peixe, F. Baquero, R. Cantón y P. Nordmann. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis*. 2008; **14**: 195-200.
30. Coque, M., A. Oliver, J. Pérez-Díaz, F. Baquero y R. Cantón. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum β -lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; **46**: 500-10.
31. Coque, M., M. Varela, A. Oliver, M. Morosini, F. Baquero y R. Cantón. Cambio epidemiológico en las BLEE. Hospital Ramón y Cajal (1988-2000): de SHV a CTX-M. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2002; **20**: 137.
32. Cortés, P., V. Blanc, A. Mora, G. Dahbi, J. Blanco, M. Blanco, C. López, A. Andreu, F. Navarro, M. Alonso, G. Bou, J. Blanco y M. Llagostera. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Appl Environ Microbiol*. 2010; **76**: 2799-805.
33. Couturier, M., F. Bex, P. Bergquist y W. Maas. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev*. 1988; **52**: 375-95.
34. Chalmers, R. y N. Kleckner. Tn10/IS10 transposase purification, activation, and *in vitro* reaction. *J Biol Chem*. 1994; **269**: 8029-35.

35. Christie, P. Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim Biophys Acta*. 2004; **1694**: 219-34.
36. Datta, N. y V. Hughes. Plasmids of the same Inc group in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. *Nature*. 1983; **306**: 616-7.
37. De Champs, C., D. Rouby, D. Guelon, J. Sirot, D. Sirot y D. Beytout. A case-control study of an outbreak of infections caused by *Klebsiella pneumoniae* strains producing CTX-1 (TEM-3) betalactamase. *J Hosp Infect*. 1991; **18**: 5-13.
38. De Rore, H., K. Demolder, E. De Wilde, E. Top, F. Houwen y W. Verstraete. A transfer of the catabolic plasmid RP4:Tn4371 to indigenous soil bacteria and its effects on respiration and biphenyl breakdown. *FEMS Microbiol Ecol*. 1994; **15**: 71-7.
39. DeRyke, C., D. Maglio y D. Nicolau. Defining the need for new antimicrobials: Clinical and economic implications of resistance in the hospitalised patient. *Expert Opin Pharmacother*. 2005; **6**: 873-89.
40. Deutsches Institut für Normung. *Med Microbiol-susceptibility testing of pathogens to antimicrobial agents*. Berlin: 1999.
41. Díaz, M., J. Hernández-Bello, J. Rodríguez-Baño, L. Martínez-Martínez, J. Calvo, J. Blanco y A. Pascual. The Diversity of *Escherichia coli* Producing Extended-Spectrum β -lactamases in Spain: Second Nationwide Study. *J Clin Microbiol*. 2010. doi:10.1128/JCM.02147-09
42. Díaz, M., J. Hernández, L. Martínez-Martínez, J. Rodríguez-Baño, A. Pascual y Grupo de estudio de Infección Hospitalaria (GEIH). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: segundo estudio multicéntrico (Proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; **27**: 503-10.
43. DiPersio, J., L. Deshpande, D. Biedenbach, A. Toleman, R. Walsh y R. Jones. Evolution and dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella*

pneumoniae: epidemiology and molecular report from the SENTRY. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005; **51**: 1-7.

44. Dougherty, T., A. Koller y A. Tomasz. Penicillin-binding proteins of penicillin-susceptible and intrinsically resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1980; **18**: 730-7.

45. Drönen, A., V. Torsvik, J. Goksoyr y E. Top. Effect of mercury addition on plasmid incidence and gene mobilizing capacity in bulk soil. *FEMS Microbiol Ecol*. 1998; **27**: 381-94.

46. Eckert, C., V. Gautier y G. Arlet. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*_{CTX-M} genes. *J Antimicrob Chemother*. 2006; **57**: 14-23.

47. Eveillard, M., J. Schmit y F. Eb. Antimicrobial use prior to the acquisition of multiresistant bacteria. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2002; **23**: 155-8.

48. Francia, V., A. Varsaki, M. Garcillán-Barcia, A. Latorre, C. Drainas y F. de la Cruz. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev*. 2004; **28**: 79-100.

49. Fritsche, T., H. Sader, M. Toleman, W. Timothy y R. Jones. Emerging metallo- β -lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis*. 2005; **4**: S276-8.

50. Fulthorpe, R. y R. Wyndham. Transfer and expression of the catabolic plasmid pBRC60 in wild bacterial recipients in a fresh water ecosystem. *Appl Environ Microbiol*. 1991; **57**: 1546-53.

51. García, A., F. Navarro, E. Miró, B. Mirelis, S. Campoy y P. Coll. Characterization of the highly variable region surrounding the *bla*_{CTX-M-9} gene in non-related *Escherichia coli* from Barcelona. *J Antimicrob Chemother*. 2005; **56**: 819-26.

52. García, A., F. Navarro, E. Miró, L. Villa, B. Mirelis, P. Coll y A. Carattoli. Acquisition and diffusion of *bla*_{CTX-M-9} gene by R478-IncHI2 derivative plasmids. *FEMS Microbiol Lett.* 2007; **271**: 71-7.
53. García, A., M. Rebollo y F. Navarro. Difusió de la resistència als antimicrobians. Diferents camins amb un mateix final. A: Ruiz y Editor. *Antimicrobians. Treballs de la Societat Catalana de Biologia.* Barcelona: Societat Catalana de Biologia. 2004: 29-48.
54. García, J., M. Fresnadillo, J. Arce y E. García. Antibióticos β -lactámicos. En: García Sánchez, J., López, R., Prieto J. Editores. Antimicrobianos en medicina. *Barcelona: Sociedad Española de Quimioterapia/Prous Science.* 1999: 213-26.
55. García, J., M. Fresnadillo y E. García. Antibióticos β -lactámicos: concepto y clasificación. *Medicine.* 1998; **88**: 4109-15.
56. Garcillán-Barcia, M., M. Francia y F. de la Cruz. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiology Reviews.* 2009; **33**: 657-87. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00168.x>
57. Gniadkowski, M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect.* 2001; **7**: 597-608.
58. Gonollu, N., Z. Aktas, C. Kayacan, M. Salcioglu, A. Carattoli, D. Yong y T. Walsh. Dissemination of CTX-M-15 β -lactamase genes carried on Inc FI and FII plasmids among clinical isolates of *Escherichia coli* in a University Hospital in Istanbul, Turkey. *J Clin Microbiol.* 2008; **46**: 1110-2.
59. Grigoryan, L., F. Haaijer-Ryskamp, J. Burgerhof, R. Mechtler, R. Deschepper, A. Tambic-Andrasevic, R. Andrajati, D. Monnet, R. Cunney, A. Di Matteo, H. Edelstein, R. Valinteliene, A. Alkerwi, E. Scicluna, P. Grzesiowski, A. Bara, T. Tesar, M. Cizman, J. Campos, C. Stlsby-Lundborg y J. Birkin. Self-medication with antimicrobial drugs in Europe. *Emerg Infect Dis.* 2006; **12**: 452-9.

60. Grinsted, J. y P. Bennet. Plasmid technology. *Londres: Academic Press*. 1988.
61. Gstalter, M., M. Faelen, N. Mine, E. Top, M. Mergeay y M. Couturier. Replication functions of new broad host range plasmids isolated from polluted soils. *Res Microbiol*. 2003; **154**: 499-509.
62. Guardabassi, L. y C. Courvalin. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. pág. 1-18. En: *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. Washington; D. C: Aarestrup, F. ASM Press. 2006.
63. Hakenbeck, R., M. Tarpay y A. Tomasz. Multiple changes of penicillin-binding proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1980; **17**: 364-71.
64. Harrif-Heraud, Z., C. Arpin, S. Benliman y C. Quentin. Molecular epidemiology of a nosocomial outbreak due to SHV-4-producing strains of *Citrobacter diversus*. *J Clin Microbiol*. 1997; **35**: 2561-7.
65. Hartman, B. y A. Tomasz. Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 1984; **158**: 513-6.
66. Helfand, M. y R. Bonomo. β -lactamases: A survey of protein diversity. *Curr drug Targets Infect disord*. 2003; **3**: 9-23.
67. Hernández, J., L. Martínez, R. Cantón, M. Coque, A. Pascual y Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; **49**: 2121-25.
68. Hernández, J., A. Pascual, R. Cantón y L. Martínez. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003; **21**: 77-82.

69. Hernández, J., A. Pascual, L. Martínez y GEIH (Grupo de estudio de Infección Hospitalaria) Proyecto GEIH-BLEE 2000. Aislamiento de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en hospitales españoles. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002; **20**: 125.
70. Hopkins, K., E. Liebana, L. Villa, M. Batchelor, E. Threlfall y A. Carattoli. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY β -lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; **50**: 3203-6.
71. Jack, G. y M. Richmond. Comparative amino acid contents of purified betalactamasas from enteric bacteria. *FEBS Lett.* 1970; **12**: 30-32.
72. Jones, R., D. Biedenbach y A. Gales. Sustained activity and spectrum of selected extended-spectrum β -lactams (carbapenems and cefepime) against *Enterobacter spp.* and ESBL-producing *Klebsiella spp.*: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (USA, 1997 - 2000). *Int J Antimicrob Agents.* 2003; **21**: 1-7.
73. Lartigue, M., L. Poirel y P. Nordmann. Diversity of genetic environment of *bla*_{CTX-M} genes. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; **234**: 201-7.
74. Lautenbach, E., J. Patel, W. Bilker, P. Edelstein y N. Fishman. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis.* 2001; **32**: 1162-71.
75. Livermore, D. Betalactamasas in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995; **8**: 557-84.
76. Livermore, D. Epidemiology of antibiotic resistance. *Intensive Care Med.* 2000; **26**: S1-S21.
77. Livermore, D., R. Cantón, M. Gniadkowski, P. Nordmann, G. Rossolini, G. Arlet, J. Ayala, M. Coque, I. Kern-Zdanowicz, F. Luzzaro, L. Poirel y N. Woodford. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007; **59**: 165-74.

78. Livermore, D., M. Warner y S. Mushtaq. Evaluation of the chromogenic MAST Cica- β -Test for detecting ESBLs, AmpC and metallo- β -lactamases. *47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago IL*. 16-19 septemeber 2007; **D-1557**.
79. Lorian, V. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 5a Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001.
80. Llosa, M., F. Gomis-Ruth, M. Coll y F. de la Cruz. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol*. 2002; **45**: 1-8.
81. Madigan, M., J. Martinko y J. Parker. *Brock Biology of Microorganims*. 10a Ed. Madrid: Pearson Prentice Hall. 2003.
82. Marchandin, H., C. Carriere, D. Sirot, H. Pierre y H. Darbas. TEM-24 produced by four different species of *Enterobacteriaceae*, including *Providencia rettgeri*, in a single patient. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; **43**: 2069-73.
83. Marín, M. y F. Gudiol. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003; **21**: 42-3.
84. Matsumoto, Y. y M. Inoue. Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; **43**: 307-13.
85. Mena, A., V. Plasencia, L. García, O. Hidalgo, J. Ayestarán, S. Alberti, N. Borrell, J. Perez y A. Oliver. Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. *J Clin Microbiol*. 2006; **44**: 2831-7.
86. Mendelman, P., D. Chaffin, T. Stull, C. Rubens, K. Mack y A. Smith. Characterization of non- β -lactamase-mediated ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1984; **26**: 235-44.

87. Mesa, R., V. Blanc, A. Blanch, P. Cortés, J. González, S. Lavilla, E. Miró, M. Muniesa, M. Saco, M. Tórtola, B. Mirelis, P. Coll, M. Llagostera, G. Prats y F. Navarro. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother.* 2006; **58**: 211-15.
88. Miró, E., B. Mirelis, F. Navarro, A. Rivera y R. Mesa. Surveillance of extended spectrum β -lactamases from clinical samples and faecal carriers in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2005; **56**: 1152-55.
89. Miró, E., C. Vergés, I. García, B. Mirelis, F. Navarro y P. Coll. Resistance to quinolones and β -lactams in *Salmonella enterica* due to mutations in topoisomerase-encoding genes, altered cell permeability and expression of an active efflux system. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004; **22**: 204-11.
90. Muniesa, M., A. García, E. Miró, B. Mirelis, G. Prats, J. Jofre y F. Navarro. Bacteriophages and diffusion of β -lactamase genes. *Emerg Infect Dis.* 2004; **10**: 1134-37.
91. Muñoz, J., M. Alonso y M. Gutierrez. En: García Sánchez, J.E., López, R, Prieto J. Eds. Antimicrobianos en Medicina. Barcelona: Sociedad Española de Quimioterapia/Prous Science. 1999: 227-50.
92. Naas, T., G. Cuzon, H. Truong, S. Bernabeu y P. Nordmann. Evaluation of a DNA microarray (Check-Points ESBL/KPC Array) for the rapid detection of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum β -lactamases (ESBLs), and KPC carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010. doi.10.1128/AAC.01298-09
93. Naas, T., L. Philippon, L. Poirel, E. Ronco y P. Nordmann. An SHV-derived extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; **43**: 1281-4.
94. Naas, T., L. Poirel, A. Karim y P. Nordmann. Molecular characterization of In50, a class 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum β -lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 1999; **15**: 411-9.

95. Nakazawa, H. y H. Ogawara. Mechanisms of acquired penicillin-resistance in *Streptomyces cacaoi*. Role of penicillin-binding proteins in penicillin resistant mutants. *J Antibiot (Tokyo)*. 1982; **35**: 1683-91.
96. Nataro, J., C. Bopp, P. Field, J. Kaper y N. Strockbine. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. En: Murray, P, Jo Baron, JH Jorgensen, ML Landry, MA Pfaller, Eds. Manual of Clinical Microbiology, 9a Ed. Washington D.C. ASM. 2007: 670-87.
97. Navarro, F., R. Mesa, E. Miró, L. Gómez, B. Mirelis y P. Coll. Evidence for convergent evolution of CTX-M-14 ESBL in *Escherichia coli* and its prevalence. *FEMS Microbiol Lett*. 2007; **273**: 120-3.
98. Navarro, F. y E. Miró. Update on CTX-M-type β -lactamases. *Rev Med Microbiol*. 2002; **13**: 63-73.
99. Navarro, F., E. Miró y B. Mirelis. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010. doi:10.1016/j.eimc.2010.05.002
100. Neuwirth, C., E. Siebor, J. Duez, A. Pechinot y A. Kazmierczak. Imipenem resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* associated with alterations in penicillin-binding proteins. *J Antimicrob Chemother*. 1995; **36**: 335-42.
101. Nicolas-Chanoine, M., J. Blanco, V. Leflon-Guibout, R. Demarty, M. Alonso, M. Caniça, Y. Park, J. Lavigne, J. Pitout y J. Johnson. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*. 2008; **61**: 273-81.
102. Nicolau, D. Carbapenems: a potent class of antibiotics. *Expert Opin Pharmacother*. 2008; **9**: 23-7.
103. Nikaido, H. The role of outer membrane and efflux pumps in the resistance of gramnegative bacteria. Can we improve drug acces? *Drug Resist Updat*. 1993; **1**: 93-98.

104. Nordmann, P., E. Ronco, T. Naas, C. Duport, Y. Michel-Briand y R. Labia. Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; **37**: 962-9.
105. Novais, A., R. Cantón, R. Moreira, L. Peixe, F. Baquero y M. Coque. Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; **51**: 796-9.
106. Novick, R. Plasmid Incompatibility. *Microbiol Rev.* 1987; **51**: 381-95.
107. Oliver, A., M. Coque, D. Alonso, A. Valverde, F. Baquero y R. Cantón. CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among *Enterobacteriaceae* in a Spanish hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; **49**: 1567-71.
108. Oteo, J., C. Navarro, E. Cercenado, A. Delgado-Iribarren, I. Wilhelmi, B. Orden, C. García, S. Miguelañez, M. Pérez-Vázquez, S. García-Cobos, B. Aracil, V. Bautista y J. Campos. Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J Clin Microbiol.* 2006; **44**: 2359-66.
109. Paterson, D. y R. Bonomo. Extended spectrum β -lactamases: A clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005; **18**: 657-86.
110. Peña, C., M. Pujol, C. Ardanuy, A. Ricart, R. Pallarés, J. Liñares, J. Ariza y F. Gudiol. An outbreak of hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia including strains producing extended-spectrum β -lactamase. *J Hosp Infect.* 2001; **47**: 53-59.
111. Philippon, A., G. Arlet y G. Jacoby. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; **46**: 1-11.
112. Pitout, J., D. Church, D. Gregson, B. Chow, M. McCracken, M. Mulvey y K. Laupland. Molecular epidemiology of CTX-M producing *Escherichia coli* in the Calgary

health region: Emergence of CTX-M-15 producing isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; **51**: 1281-6.

113. Pitout, J., N. Hanson, D. Church y K. Laupland. Population based laboratory surveillance for *Escherichia coli*-producing extended-spectrum betalactamases: Importance of community isolates with *bla*_{CTX-M} genes. *Clin Infect Dis.* 2004; **38**: 1736-41.

114. Poirel, L., I. Le Thomas, T. Naas, A. Karim y P. Nordmann. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; **44**: 622-32.

115. Poirel, L., T. Naas y P. Nordmann. Diversity, epidemiology and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; **54**: 24-38.

116. Poirel, L., G. Weldhagen, T. Naas, C. De Champs, M. Dove y P. Nordmann. GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; **45**: 2598-603.

117. Prats, G. y B. Mirelis. Enterobacteriaceae. En: Perea E.J. Ed. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Barcelona: Doyma. 1992: 624-46.

118. Quesada, M., M. Giménez, S. Molinos, G. Banqué, E. Miró, A. Ramírez y V. Ausina. Evaluación de un método rápido Cica-Beta-Test (Kanto Chemical ®) para la detección de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), metalo-betalactamasas y AmpC. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, XIII Congreso SEIMC. Madrid.* 11-14 mayo 2008; **P-499**.

119. Richmond, M. y R. Sykes. The betalactamases of gramnegative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol.* 1973; **9**: 31-88.

120. Rodríguez-Baño, J., M. Navarro, L. Romero, M. Muniain, M. de Cueto, M. Ríos, J. Hernandez y A. Pascual. Bacteremia due to extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: a new clinical challenge. *Clin Infect Dis.* 2006; **43**: 1407-14.

121. Romero, L., L. López, J. Rodríguez, J. Hernández, L. Martínez y A. Pascual. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2005; **11**: 625-31.
122. Rossolini, G., N. Franceschini y L. Lauretti. Cloning of a *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) *meningosepticum* chromosomal gene *blaA* (CME) encoding an extended-spectrum class A β -lactamase related to the bacteroides cephalosporinases and the VEB-1 and PER β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; **43**: 2193-99.
123. Sabaté, M., E. Miró, F. Navarro, B. Mirelis, J. Barbé y G. Prats. Caracterización de un nuevo integrón In60 portador de una β -lactamasa de espectro ampliado (*bla*_{CTX-M-9}). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002; **20**: 348.
124. Sabaté, M., E. Miró, F. Navarro, C. Vergés, R. Aliaga, B. Mirelis y G. Prats. β -lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). *J Antimicrob Chemother.* 2002; **49**: 989-97.
125. Sabaté, M., F. Navarro, E. Miró, S. Campoy, B. Mirelis y J. Barbé. Novel complex sul1-type integron in *Escherichia coli* carrying *bla*_{CTX-M-9}. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; **46**: 2656-61.
126. Silva, J., C. Aguilar, G. Ayala, M. Estrada, U. Garza-Ramos, R. Lara-Lemus y L. Ledezma. TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; **44**: 997-1003.
127. Sougakoff, W., S. Goussard y P. Courvalin. The TEM-3 β -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. *FEMS Microbiol Lett.* 1988; **56**: 343-48.
128. Sturenburg, E., I. Sobottka, H. Feucht, D. Mack y R. Laufs. Comparison of BDPhoenix and VITEK2 automated antimicrobial susceptibility test systems for extended-

spectrum beta-lactamase detection in *Escherichia coli* and *Klebsiella* species clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003; **45**: 29-34.

129. Suarez, C. y F. Gudiol. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009; **27**: 116-29.

130. Suzuki, S., N. Shibata, K. Yamane, J. Wachino, K. Ito y Y. Arakawa. Change in the prevalence of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. *J Antimicrob Chemother.* 2009; **63**: 72-79.

131. The European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases. URL: <http://www.escmid.org>.

132. The Swedish Reference Group of Antibiotics. Antimicrobial susceptibility testing in Sweden. *Scand J Infect Dis.* 1997; **105**: 5-31 (updates on <http://www.srga.org>).

133. Toleman, M., K. Rolston, R. Jones y T. Walsh. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; **47**: 2859-63.

134. Vahaboglu, H., S. Dodanli, C. Eroglu, R. Ozturk, G. Soyletir, I. Yildirim y V. Avkan. Characterization of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium* strains: molecular epidemiology of PER-1-producing isolates and evidence for nosocomial plasmid exchange by a clone. *J Clin Microbiol.* 1996; **34**: 2942-6.

135. Vahaboglu, H., R. Ozturk, G. Aygun, F. Coskuncan, A. Yaman, A. Kaygusuz, H. Leblebicioglu, I. Balik, K. Aydin y M. Otkun. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; **42**: 484.

136. Waley, S. Betalactamase: mechanism of action. En M. I. Page Ed. The chemistry of β -lactam. London: Blackie A. 1992.

137. Walther-Rasmussen, J. y N. Hoiby. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2006; **57**: 373-83.
138. Webber, M. y L. Piddock. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2003; **51**: 9-11.
139. White, D. y P. McDermott. Emergence and transfer of antibacterial resistance. *J Dairy Sci.* 2001; **84**: E151-E55.
140. Wiener, J., J. Quinn, P. Bradford, R. Goering, C. Nathan y K. Bush. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *JAMA.* 1999; **281**: 517-23.
141. Williamson, R., C. le Bouguenec, L. Gutmann y T. Horaud. One or two low affinity penicillin-binding proteins may be responsible for the range of susceptibility of *Enterococcus faecium* to benzylpenicillin. *J Gen Microbiol.* 1985; **131**: 1933-40.
142. Yao, J. y R. Moellering. Antibacterial agents. En Murray, PR; Baron, EJ; Jorgensen, JH; Landry, ML; Pfaller, MA; Tenover, R; Tenover, R; Eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 9na Ed. Washington DC: Asm Press. 2007: 1077-113.

6. ANEXOS

6.1 ANEXO 1

Diestra, K., M. Coque, E. Miró, J. Oteo, C. Juan, T. Curiao, B. Moyá, J. Campos, R. Cantón, A. Oliver and F. Navarro. Caracterización y epidemiología molecular de BLEE en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en 11 hospitales españoles. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008; 26: 404-10.

- *Factor de Impacto* : 1,432

- *Nº Citas*: 5

Caracterización y epidemiología molecular de betalactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en once hospitales españoles (2004)

Karol Diestra^a, Teresa M. Coque^{b,c}, Elisenda Miró^a, Jesús Oteo^d, Carlos Juan Nicolau^e, José Campos^d, Bartolomé Moyá^e, Tânia Curiao^b, María Pérez-Vázquez^d, Rafael Cantón^{b,c}, Antonio Oliver^e, Ferran Navarro^a y Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI)

^aServicio de Microbiología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. ^bServicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid. ^cUnidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana asociada al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Madrid. ^dLaboratorio de Antibióticos. Servicio de Bacteriología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid. ^eServicio de Microbiología. Hospital Son Dureta. Palma de Mallorca. España.

INTRODUCCIÓN. Se analizó la distribución epidemiológica de los diferentes tipos de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en distintos hospitales de España y se comparó con estudios previos.

MÉTODOS. En 11 hospitales españoles se recogieron los 15 primeros aislamientos de *E. coli* y los 5 primeros de *K. pneumoniae* con sospecha de ser portadores de BLEE, aislados en el primer trimestre de 2004. Los estudios de clonalidad se realizaron mediante electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE) tras digestión del ADN total con XbaI y mediante ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Secuencias-Polimerase Chain Reaction*). Las BLEE se caracterizaron mediante isoelectroenfoque, PCR y secuenciación.

RESULTADOS. Se estudiaron 124 aislamientos. El análisis de los patrones de restricción obtenidos por PFGE mostró una gran diversidad clonal entre los aislamientos de *E. coli*, observándose cuatro agrupaciones de dos cepas en cada una de ellas. En las 92 cepas de *E. coli*, la caracterización de las BLEE mostró un predominio de CTX-M-14 (45,7%), CTX-M-9 (20,6%) y SHV-12 (21,7%). En las 32 cepas de *K. pneumoniae* se observó una menor diversidad clonal, detectándose tres agrupaciones que incluían el 53,1% de los aislamientos. Las BLEE detectadas en estas cepas fueron del tipo CTX-M en 20 casos (62,5%) (CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-14 y CTX-M-15), de tipo SHV en 11 (34,4%) (SHV-12 y SHV-5) y TEM-4 (3,1%) en una.

CONCLUSIÓN. Las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* analizadas en ese período presentan una mayor diversidad de BLEE que la observada en estudios epidemiológicos realizados con anterioridad. Además, el análisis de la relación clonal definió una gran diversidad en *E. coli* y menor en *K. pneumoniae*.

Palabras clave: *Escherichia coli*. *Klebsiella pneumoniae*. Betalactamasas de espectro extendido.

Correspondencia: Dr. F. Navarro.
Servicio de Microbiología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
Avda. Sant Antoni Maria Claret, 167. 08025 Barcelona. España.
Correo electrónico: fnavarro@santpau.cat

Manuscrito recibido el 22-6-2007; aceptado el 29-10-2007.

Characterization and molecular epidemiology of ESBL in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in 11 Spanish hospitals (2004)

INTRODUCTION. The epidemiological distribution of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) types in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* was evaluated in various hospitals in Spain and compared with previous studies.

METHODS. A total of 11 Spanish hospitals participated in this study. Each center collected the first 15 isolates of *E. coli* and the first 5 of *K. pneumoniae* suspected of being ESBL-producers and isolated during the first quarter of 2004. Clonal study was done by PFGE after total DNA digestion with XbaI and by ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Secuencias-Polimerase Chain Reaction), typing. ESBL-producers were characterized by isoelectric focusing (IEF), PCR and sequencing.

RESULTS. A total of 124 strains were collected. PFGE restriction patterns showed considerable diversity among *E. coli* strains; 4 clusters of 2 strains each were detected. ESBL characterization of 92 *E. coli* strains showed a predominance of CTX-M-14 (45.7%), CTX-M-9 (20.6%) and SHV-12 (21.7%). Clonal diversity among the 32 *K. pneumoniae* strains was less pronounced than in *E. coli*; 3 clusters included 53.1% of strains. The ESBL detected in these strains included a CTX-M type in 20 cases (62.5%) (CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-14 and CTX-M-15); a SHV type in 11 (34.4%) (SHV-12 and SHV-5) and TEM-4 (3.1%) in 1 case.

CONCLUSION. The *E. coli* and *K. pneumoniae* strains analyzed in this period displayed a greater diversity of ESBL than has been observed in previous epidemiological studies. Analysis of clonal relationships revealed a greater diversity in *E. coli* than in *K. pneumoniae*.

Key words: *Escherichia coli*. *Klebsiella pneumoniae*. Extended spectrum beta-lactamases.

Introducción

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), descritas frecuentemente en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y en menor medida en otras enterobacterias, confieren resistencia a cefalosporinas de amplio espectro y constituyen un grupo heterogéneo de enzimas¹⁻³. Las infecciones en las que están implicadas representan un reto debido a que, con frecuencia, los microorganismos que las producen son también resistentes a otros antimicrobianos, como trimetoprima-sulfametoxazol, aminoglucósidos y fluoroquinolonas, limitando las opciones terapéuticas^{2,4}. Estas enzimas presentan una gran dispersión, lo cual parece ser dependiente del elemento móvil que vehicula el gen *bla*_{BLEE}.

En un inicio, la descripción de BLEE se englobaba en el contexto de brotes hospitalarios que frecuentemente implicaban *K. pneumoniae* y BLEE derivadas de SHV-1 o de TEM-1^{1,5}. En los últimos años se ha detectado el incremento de las BLEE del tipo CTX-M. Su difusión en bacterias de la misma o de diferente especie se ha asociado a ciertos elementos genéticos, como las secuencias de inserción, los transposones y los plásmidos^{1,5,6}. Aunque con menor frecuencia, también se ha descrito la dispersión clonal de cepas productoras de este tipo de BLEE, principalmente de la CTX-M-15^{7,8}.

El incremento en la prevalencia de microorganismos con BLEE ha sido descrito por distintos autores, tanto en el ámbito nacional como internacional⁹⁻¹². El Sistema Europeo de Vigilancia de Resistencias Antimicrobianas en patógenos invasores (EARSS) observó que la resistencia a cefalosporinas de tercera generación asociada con la producción de BLEE en *E. coli* aumentó en casi todos los países europeos incluidos en el estudio, y concretamente en España creció del 1,6 a 4,1% en el período 2001-2003¹¹. El estudio relaciona este incremento con el uso abusivo de antibióticos de amplio espectro¹¹.

En un estudio multicéntrico realizado en España durante el año 2000 (proyecto GEIH-BLEE 2000) para determinar la prevalencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* portadoras de BLEE en 40 hospitales españoles se constató que en *E. coli* las BLEE CTX-M-9, CTX-M-14 y SHV-12 constituían el 70% de las enzimas detectadas, mientras que en *K. pneumoniae* más del 50% fueron del tipo TEM¹³.

Últimamente son varios los hospitales españoles que han evidenciado un cambio en la prevalencia de las diferentes enzimas detectadas en *E. coli* y *K. pneumoniae*¹⁴⁻¹⁷. Es por ello que en la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI) se planteó la necesidad de realizar el presente estudio multicéntrico, el cual permitiría conocer y actualizar la evolución y tipo de BLEE en *E. coli* y *K. pneumoniae* en distintos hospitales de España y descartaría, mediante estudios moleculares, la posible expansión clonal de los microorganismos con estas enzimas.

Material y métodos

Centros participantes

En este estudio participaron un total de 11 hospitales españoles además del Centro Nacional de Microbiología (CNM) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Los hospitales participantes fueron: Corpo-

ració Hospitalària Parc Taulí (CPT), de Sabadell; Hospital Germans Trias i Pujol (HGTP), de Badalona; Hospital Vall d'Hebron (HVH), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSP) y Hospital Clínic (HC), de Barcelona; Hospital de Bellvitge (HB), de l'Hospitalet; Hospital Son Dureta (HSD), de Palma de Mallorca; Hospital de la Ribera (HR), de Alzira; Hospital Virgen Macarena (HVM) y Hospital Virgen del Rocío (HVR), de Sevilla, y Hospital Universitario Ramón y Cajal (HRC), de Madrid.

Recolección de cepas y estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos

Se solicitó a los centros participantes el envío de los 15 primeros aislamientos de *E. coli* y los 5 primeros de *K. pneumoniae* con sospecha fenotípica de ser portadores de BLEE y aislados en el primer trimestre de 2004. Sólo se consideró una cepa por paciente.

En total se recogieron 142 aislamientos, 15 en el HGTP, HVH, HRC, HVR y HC; 14 en el HSP, CPT y HSD; 11 en el HVM; 10 en el HB; y 4 en el HR.

Posteriormente, el CNM verificó la sensibilidad a antibióticos, tanto betalactámicos como no betalactámicos, mediante técnica de microdilución¹⁸ utilizando el sistema comercial Phoenix (BD Phoenix Automated Microbiology System: Becton-Dickinson Diagnosis, Sparks, MD, Estados Unidos). La cepa de *E. coli* ATCC 25922 se utilizó como control.

Al mismo tiempo se recogieron los datos demográficos de los pacientes (sexo, edad, área de hospitalización y tipo de muestra). Se consideró como criterio de infección nosocomial cuando el paciente llevaba más de 48 h de hospitalización, y de infección adquirida en la comunidad cuando llevaba menos de 48 h, siendo conscientes de las limitaciones de este criterio, que puede infraestimar el número de infecciones nosocomiales.

Estructura poblacional

Los estudios de clonalidad se realizaron en el CNM mediante electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE) tras digestión del ADN total con XbaI según la metodología previamente descrita⁷. Los pulsotipos se consideraron idénticos, probablemente relacionados, posiblemente relacionados o distintos, en función de los criterios de Tenover¹⁹. Los aislamientos, cuyo ADN no pudo ser digerido con XbaI se estudiaron mediante Rep-PCR²⁰ en comparación con aquellos que se consideraron epidemiológicamente relacionados (mismo servicio hospitalario, mismo período de tiempo).

Caracterización de las BLEE

La caracterización de las BLEE se realizó mediante isoelectroenfoque (IEF)²¹, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación¹⁵. Para la conjugación se utilizaron las cepas *E. coli* HB101 resistente a kanamicina y rifampicina, *E. coli* BM694 y *E. coli* BM21, ambas resistentes a ácido nalidixico y se calculó la frecuencia de conjugación²².

Cálculos estadísticos

Los resultados fueron sometidos a procesamiento estadístico con el programa STATCALC y se aplicó la prueba de la chi al cuadrado para la comparación de proporciones con un nivel de significación de $p < 0,05$. Los resultados se expresan en porcentajes.

Resultados

Pacientes y cepas

Se ha estudiado un total de 102 cepas de *E. coli* y 40 de *K. pneumoniae*. Se descartaron 18 (10 *E. coli* y 8 *K. pneumoniae*) por presentar un fenotipo compatible con hiperproducción de su betalactamasa cromosómica.

Las 124 cepas restantes fueron aisladas de 54 varones (43%) y 70 mujeres (57%). En función del tipo de infección,

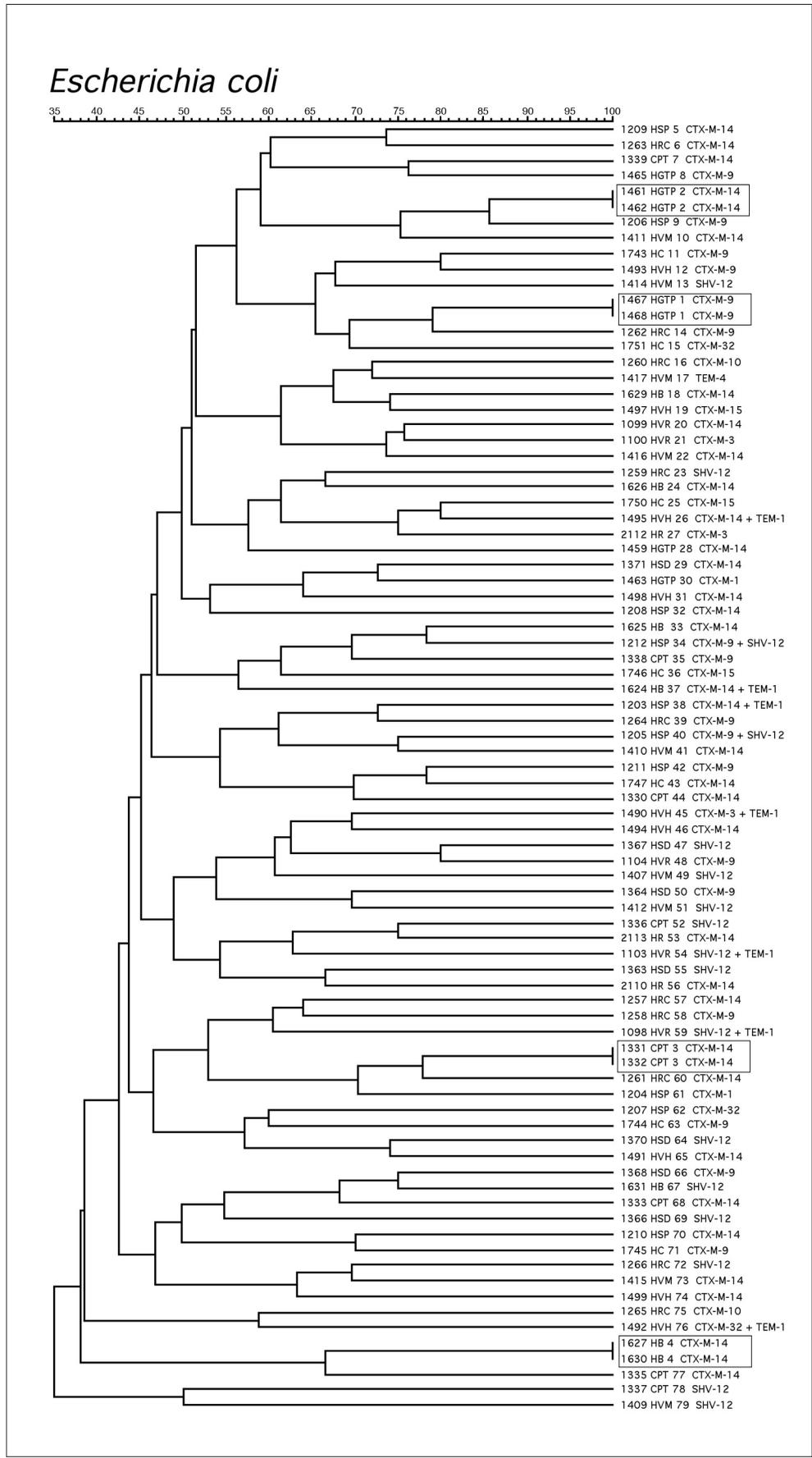


Figura 1. Dendrograma de las 83 cepas de *Escherichia coli* con beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE). Se detalla el número de cepa, las iniciales del hospital de procedencia, el pulsotipo y finalmente la BLEE identificada.

el 51,6% fueron infecciones nosocomiales, mientras que el 48,4% fueron comunitarias.

Al desglosar estas características epidemiológicas en función del microorganismo aislado, se observó que la infección por *E. coli* tuvo lugar en 34 varones (37%) y 58 mujeres (63%); en 39 de los casos (42,4%) fueron infecciones nosocomiales y en 53 (57,6%) comunitarias. Por el contrario, la infección por *K. pneumoniae* tuvo lugar en 20 varones (62,5%) y 12 mujeres (37,5%); en 25 casos (76%) fueron infecciones nosocomiales y en 7 (25%) comunitarias.

Los servicios de los que provenían los pacientes con infección intrahospitalaria por *E. coli* y *K. pneumoniae* fueron principalmente: medicina interna (48,7 y 44%, respectivamente), cirugía (25,6 y 16%), unidad de cuidados intensivos (12,8 y 20%), pediatría (7,7 y 4%), consultas externas (2,6 y 4%) y otros (2,6 y 12%). En ningún caso las diferencias llegaron a ser estadísticamente significativas. Las cepas de *E. coli* se aislaron de orina (68,5%), sangre (10,9%), exudados (8,7%), muestras respiratorias (3,3%), líquidos estériles (2,2%), catéteres (1,1%) y otras muestras (5,4%); y las cepas de *K. pneumoniae* se aislaron de orina (43,8%), exudados (21,9%), sangre (12,5%), muestras respiratorias (12,5%), líquidos estériles (3,1%), catéteres (3,1%) y otras muestras (3,1%).

El rango de edad de los pacientes en los que se aisló *E. coli* osciló entre 1 mes y 97 años, y la media era de 60 años. En el caso de *K. pneumoniae* el rango fue de 1 día a 90 años y la media de 57 años. Ocho pacientes (6,5%) presentaron edades inferiores a 1 año, cuatro (3,2%) edades comprendidas entre 2 y 14 años, tres (2,4%) entre 15 y 25 años, 12 (9,7%) entre 26 y 45 años, 36 (29%) entre 46 y 65 años, y finalmente, 61 (49,2%) mayores de 65 años.

Estructura poblacional

De los 124 aislamientos estudiados por la técnica de PFGE, en 10 (9 *E. coli* y 1 *K. pneumoniae*) no se obtuvo ningún patrón de restricción con XbaI. Mediante el análisis por Rep-PCR se descartó la asociación clonal de estos 9 aislamientos de *E. coli*, entre ellos y respecto a aquellos que por fecha y lugar de aislamiento y tipo de BLEE producida se consideró que pudieran estar epidemiológicamente relacionados.

El análisis comparativo de los patrones de ADN genómico obtenidos por PFGE mostró una gran diversidad clonal entre los aislamientos de *E. coli* (fig. 1). Sólo se observaron cuatro agrupaciones de dos cepas cada uno con pulsotipos idénticos pertenecientes a tres hospitales distintos: dos en el HGTP (clones 1 y 2) y los otros dos en el HVH (clon 3) y el HB (clon 4). No se detectó ninguna transmisión interhospitalaria.

En *K. pneumoniae* se observó una menor diversidad clonal, detectándose tres agrupaciones que incluían 18 (53,1%) de los 32 aislamientos estudiados. La agrupación 1 estaba constituida por cuatro cepas con pulsotipos idénticos procedentes del HVR. La agrupación 2 incluía 10 cepas, genéticamente relacionadas y subagrupadas en cuatro cepas idénticas del HSD (patrón 2), una cepa del HSP probablemente relacionada (diferencia de dos bandas) (patrón 2a), y otras cuatro iguales, dos a dos, procedentes del HC probablemente relacionadas entre ellas (diferencia de una banda) y con las cepas del patrón 2 (diferencia de tres bandas) (patrón 2b y 2c). La cepa 1213 del HSP también se incluyó en la agrupación 2 (patrón 2d),

considerándose posiblemente relacionada con el patrón 2. Se detectó una tercera agrupación (patrón 3) con cuatro cepas del CPT, tres idénticas y una cuarta probablemente relacionada (patrón 3a) (fig. 2).

Caracterización de BLEE

Se obtuvieron transconjugantes en el 72,6% de las cepas en las que se realizaron los ensayos de transferencia. La frecuencia de conjugación fue muy variable, entre 3×10^{-8} hasta $> 10^{-1}$. Se obtuvieron transconjugantes en 70 de las 92 cepas de *E. coli* (76%) y en 20 de las 32 de *K. pneumoniae* (62,5%), sin que se detectara ninguna relación entre la frecuencia de conjugación y el tipo de BLEE implicada.

De la caracterización genética de las BLEE se obtuvo que 74 (80,4%) de las 92 cepas de *E. coli* presentaron una BLEE tipo CTX-M; 42 (45,7%), CTX-M-14; 19 (20,6%), CTX-M-9; dos (2,2%), CTX-M-1; tres (3,3%), CTX-M-15; tres (3,3%), CTX-M-3; tres (3,3%), CTX-M-32; dos (2,2%), CTX-M-10, y 20 (21,7%), SHV-12. Dos de estas cepas expresaron conjuntamente SHV-12 y CTX-M-9 (tabla 1).

De las 32 cepas de *K. pneumoniae*, 20 (62,5%) presentaron una BLEE tipo CTX-M; 10 (31,3%) CTX-M-1, siete (21,9%) CTX-M-9, dos (6,3%) CTX-M-14, una (3,1%) CTX-M-15; 11 (34,4%) de tipo SHV, 10 (31,3%) SHV-12 y una (3,1%) SHV-5; y una TEM-4 (3,1%) (tabla 2).

De las cuatro agrupaciones de dos aislamientos cada una detectadas en *E. coli*, tres de ellas son productoras de CTX-M-14 y una de CTX-M-9 (fig. 1). En *K. pneumoniae*, la agrupación 1 produce una SHV-12, la agrupación 3 una CTX-M-9, y la agrupación 2 que afecta a tres hospitales distintos una CTX-M-1 (fig. 2).

En función de la BLEE y el tipo de microorganismo, las cepas mostraron una multiresistencia a dos o más antibióticos no betalactámicos, principalmente a tetraciclina (de 62,5 a 94,5%), ácido nalidíxico (de 69 a 89%) y cotrimoxazol (de 33,3 a 44,5%) (tabla 3).

Discusión

El creciente aumento de las infecciones por BLEE es un problema mundial que conlleva el incremento de la resistencia a antimicrobianos de primera elección, tanto en la comunidad como en los hospitales. Este aumento se atribuye, en general, al uso inadecuado de antimicrobianos y al intercambio de elementos genéticos de resistencia entre microorganismos²³.

La prevalencia de cepas con BLEE puede ser muy variable entre diferentes países, ciudades e incluso hospitales de una misma ciudad^{24,25}. Además, las BLEE detectadas pueden variar de una institución a otra. Son varios los estudios de seguimiento de BLEE en centros españoles donde se evidencia esta distinta distribución e incidencia^{9,10,21,26,27}.

Las características demográficas de los pacientes portadores de BLEE en el presente estudio son similares a los estudios previamente publicados¹⁰. Es de destacar la mayor prevalencia de infecciones nosocomiales por *K. pneumoniae* que por *E. coli* (el 76 frente al 42%; $p = 0,001$). Alrededor del 75% de 50 estudios epidemiológicos realizados a escala mundial (donde se recogen datos de más de 3.000 pacientes) han revelado que las infecciones nosoco-

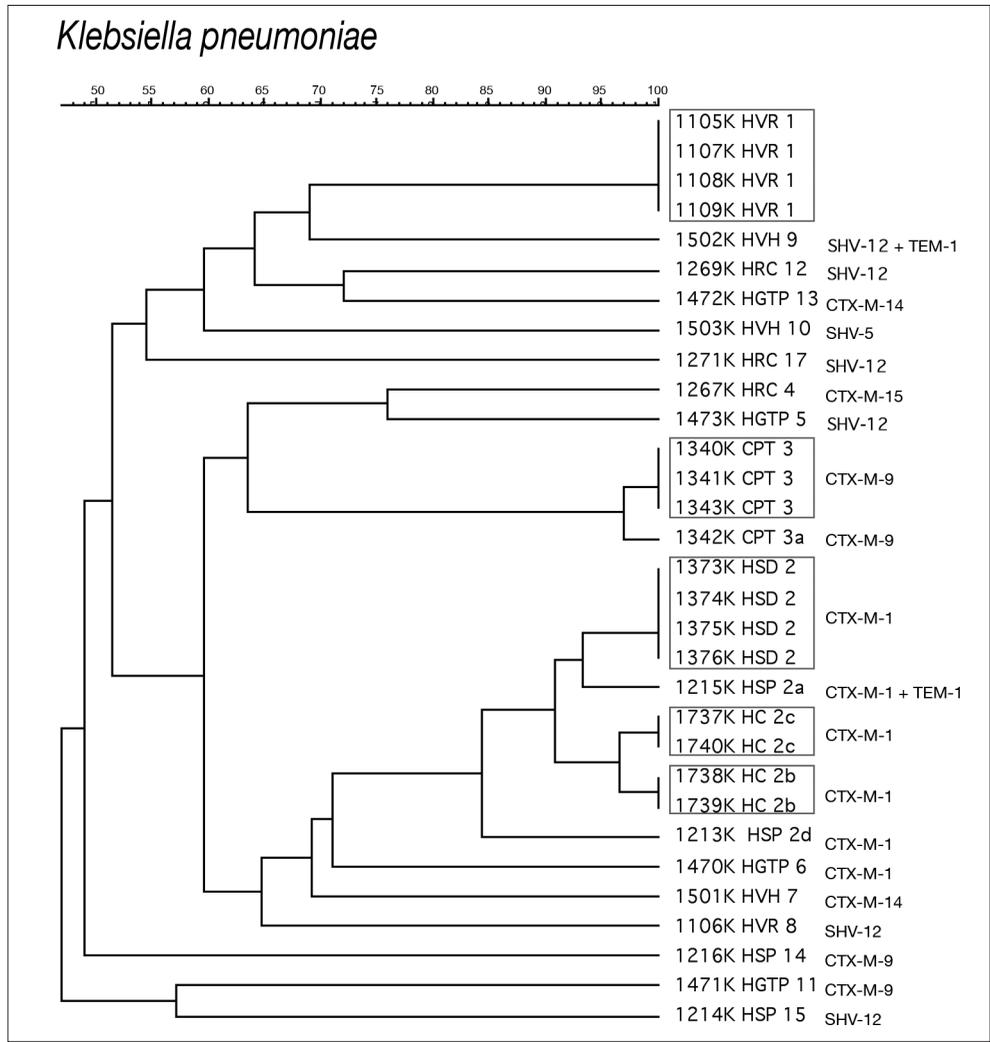


Figura 2. Dendrograma de las 31 cepas de *Klebsiella pneumoniae* con betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Se detalla el número de cepa, las iniciales del hospital de procedencia, el pulsotipo y finalmente la BLEE identificada.

TABLA 1. Betalactamasas de espectro extendido caracterizadas en *Escherichia coli*

Centro	Nº de cepas	CTX-M-1	CTX-M-3	CTX-M-9	CTX-M-10	CTX-M-14	CTX-M-15	CTX-M-32	SHV-12
CPT	10			1		6			3
HGTP	8	1		3		4			
HSP	10	1		4 ^b		4 ^a		1	2 ^b
HVH	9		1 ^c	1		5 ^a	1	1	
HC	8			4		1	2	1	
HB	8					7 ^a			1
HSD	9			2		3			4
HR	4		1			3			
HVR	6		1	1		1			3 ^d
HVM	10					5			5
HRC	10			3	2	3			2
	92	2 (2,2%)	3 (3,3%)	19 (20,6%)	2 (2,2%)	42 (45,7%)	3 (3,3%)	3 (3,3%)	20 (21,7%)

^aUna cepa presenta CTX-M-14 + TEM-1.
^bDos cepas presentan SHV-12 + CTX-M-9.
^cPresenta CTX-M-3 + TEM-1.
^dDos cepas presentan SHV-12 + TEM-1.
 CPT: Corporació Hospitalària Parc Taulí; HGTP: Hospital Germans Trias i Pujol; HSP: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau; HVH: Hospital Vall d'Hebron; HC: Hospital Clínic de Barcelona; HB: Hospital de Bellvitge; HSD: Hospital Son Dureta; HR: Hospital de la Ribera; HVR: Hospital Virgen del Rocío; HVM: Hospital Virgen Macarena; HRC: Hospital Universitario Ramón y Cajal.

miales causadas por organismos productores de BLEE son en su mayoría causadas por *K. pneumoniae*².

Los resultados de nuestro estudio muestran que entre las cepas de *E. coli* productoras de BLEE no existe un

clon predominante. Se han encontrado pequeñas agrupaciones formadas por cepas que expresan mayoritariamente CTX-M-14. La caracterización de las BLEE mostró en *E. coli* un predominio de CTX-M-14 (45,7%), CTX-M-9

TABLA 2. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) presentes en las cepas de *K. pneumoniae*

Centro	Nº de cepas	CTX-M-1	CTX-M-9	CTX-M-14	CTX-M-15	SHV-5	SHV-12	TEM-4
CPT	4		4					
HGTP	4		2	1			1	
HSP	4	2 ^a	1				1	
HVH	3			1		1	1 ^b	
HC	4	4						
HB	0							
HSD	4	4						
HR	0							
HVR	5						5	
HVM	1							1
HRC	3				1		2	
	32	10 (31,3%)	7 (21,9%)	2 (6,3%)	1 (3,1%)	1 (3,1%)	10 (31,3%)	1 (3,1%)

^aUna cepa presenta CTX-M-1 + TEM-1.^bLa cepa presenta SHV-12 + TEM-1.TABLA 3. Porcentaje de resistencias asociadas en las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* con distintas betalactamasas de espectro extendido. Se ha incluido una cepa por clon y, en caso de electroforesis en gel de campos pulsantes y antibiogramas idénticos, sólo se ha contabilizado una cepa

	TET	NAL	CIP	SXT	CHL	TOB	KAN	GM
<i>Escherichia coli</i>								
SHV-12 (18)	94,5	89	27,8	44,5	83,4	11,1	22,2	16,7
CTX-M-1 (2)	1/2	1/2	0	1/2	0	1/2	0	1/2
CTX-M-3 (3)*	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	0	2/3	1/3
CTX-M-9 (16)	62,5	69	38	31	13	12,5	18,8	38
CTX-M-10 (2)*	2/2	2/2	0	0	0	0	0	0
CTX-M-14 (39)	73,7	79,5	79,5	33,3	51,3	25,6	13,2	10,3
CTX-M-15 (3)*	2/3	2/3	2/3	1/3	0	2/3	2/3	2/3
CTX-M-32 (2)*	2/2	1/2	1/2	2/2	2/2	0	0	0
CTX-M-9 + SHV-12 (2)*	2/2	2/2	0	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>								
SHV-12 (7)*	4/7	3/7	1/7	3/7	3/7	2/7	3/7	2/7
SHV-5 (1)*	1/1	0	0	1/1	0	0	0	0
CTX-M-1 (4)*	2/4	2/4	1/4	2/4	4/4	1/4	0	1/4
CTX-M-9 (4)*	2/4	2/4	0	3/4	3/4	3/4	0	2
CTX-M-14 (2)*	1/2	2/2	1/2	2/2	0	1/2	0	1/2
CTX-M-15 (1)*	0	1/1	1/1	0	0	0	0	0
TEM-4 (1)*	0	0	0	0	0	1/1	0	1/1

*En caso de tener menos de 10 cepas, los datos se presentan como número de cepas resistentes (numerador) y número de de cepas estudiadas (denominador).

CHL: cloranfénicol; CIP: ciprofloxacino; GM: gentamicina; KAN: kanamicina; NAL: ácido nalidíxico; SXT: cotrimoxazol; TET: tetraciclina; TOB: tobramicina.

(20,6%) y SHV-12 (21,7%), aislándose también diversos tipos de CTX-M (CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-15 y CTX-M-32). Estos resultados concuerdan con estudios puntuales anteriores, donde ya se describe, por un lado, una prevalencia mayor de CTX-M-14 que de CTX-M-9, así como un incremento en la diversidad de enzimas tipo CTX-M^{15,25,27}, la sustitución de cepas portadoras de SHV-2 por cepas con SHV-12^{14,15} o la disminución de cepas portadoras de BLEE tipo TEM. El porcentaje de cepas portadoras de BLEE tipo TEM en el año 2000 era del 19%¹⁰, mientras que en este estudio no se ha aislado ninguna cepa. Es de resaltar la baja incidencia de cepas con CTX-M-15, ampliamente diseminada en otros países europeos²⁵. Sólo se han detectado tres aislamientos de *E. coli* productores de CTX-M-15 y que no están genéticamente relacionados, al contrario de lo descrito previamente en aislamientos nosocomiales y comunitarios de distintos centros sanitarios de Madrid entre enero de 2004 y agosto de 2005⁷. En conjunto, sólo cinco cepas de *E. coli* producían una variante de CTX-M de las que habitual-

mente generan altas CMI a ceftazidima además de a cefotaxima, tres CTX-M-15 y dos CTX-M-32.

En *K. pneumoniae*, al igual que en *E. coli*, las BLEE tipo TEM han disminuido, detectándose tan sólo TEM-4 (una cepa). De la familia SHV se encontraron las enzimas SHV-12 (31,3%) y SHV-5 (3,1%), no aislándose ninguna cepa con SHV-2. Nuestros resultados son similares a los descritos en algunos hospitales españoles^{13,14}, pero difieren del estudio multicéntrico del año 2000, donde el 58% de las cepas presentaban BLEE tipo TEM y un 29% tipo SHV, describiéndose cepas con SHV-2 y SHV-2a¹⁰. Contabilizando una sola cepa con patrón de PFGE y antibiogramas idénticos, se observa que la enzima predominante en *K. pneumoniae*, dentro de la familia de las CTX-M, es CTX-M-1 y CTX-M-9, ambas con el 15,6% cada una, seguida de CTX-M-14 con el 6,2%. A diferencia de lo descrito en el estudio multicéntrico del año 2000, en el que se destacó la presencia de cepas portadoras de CTX-M-10 (13%)¹⁰ y que parece endémica en el área de Madrid^{26,28}, en este trabajo se aislaron sólo dos cepas con esta enzima.

En el presente estudio también se evidencia la aparición de cepas de *E. coli* portadoras de dos BLEE (CTX-M-9 y SHV-12). Esta asociación ha sido documentada previamente^{15,16}, aunque no se detectó en el estudio multicéntrico del año 2000¹³.

Se ha detectado una mayor homología genética entre los distintos aislamientos de *K. pneumoniae* productoras de BLEE que la observada en *E. coli*, con la presencia de pequeñas agrupaciones producidas por cepas portadoras de SHV-12, CTX-M-9 y, principalmente, de CTX-M-1. Cabe destacar la diseminación clonal interhospitalaria de aislamientos de *K. pneumoniae* productores de CTX-M-1 detectada en dos centros de Barcelona (HSP, HC) y uno de Mallorca (HSD). En este último centro se había detectado previamente la existencia de un brote intrahospitalario de *K. pneumoniae* productora de CTX-M-1²⁹.

En conclusión, las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* analizadas en este período presentan una mayor diversidad de BLEE que la observada en estudios epidemiológicos realizados con anterioridad. Además, el análisis de la relación clonal definió una gran diversidad en *E. coli* y menor en *K. pneumoniae*, aunque se detectó la presencia de cepas epidémicas de *K. pneumoniae* en diferentes áreas geográficas. Estos datos muestran la importancia de continuar con los estudios epidemiológicos de prevalencia y caracterización de estas enzimas. El incremento de su prevalencia, asociado al incremento de la resistencia a otras familias de antimicrobianos distintas de los betalactámicos, subraya la necesidad de establecer los factores que contribuyen a su expansión, incluyendo los de índole genética.

Agradecimientos

El presente estudio se ha podido realizar gracias a la financiación del Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III-FEDER, Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI C03/14) y Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI RD06/0008), a la subvención económica otorgada a los proyectos FIS PI04339, PI 040162, PI040837 y PI 042012 y gracias a la participación de los grupos de investigación de los centros participantes bajo la dirección de L. Matas y M. Giménez en el Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona, I. Sanfeliu en la Corporació Hospitalària Parc Taulí de Sabadell, G. Prats en el Hospital Vall d'Hebron de Barcelona, M. Ruiz y J. Vila en el Hospital Clínic de Barcelona, M. Domínguez en el Hospital de Bellvitge de l'Hospitalet, A. Guerrero y J. Colomina en el Hospital de La Ribera de Alzira, A. Pascual en el Hospital Virgen Macarena y J. Aznar en el Hospital Virgen del Rocío de Sevilla.

Bibliografía

- Bradford P. Extended spectrum β -lactamases in the 21st Century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:933-51.
- Paterson D, Bonomo R. Extended spectrum β -lactamases: A clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:657-86.
- Bush K, Jacoby G, Medeiros A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:1211-33.
- Rodríguez-Baño J, Navarro M, Romero L, Muniain M, de Cueto M, Ríos M, et al. Bacteremia due to extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: a new clinical challenge. *Clin Infect Dis.* 2006;43:1407-14.
- Bonnet R. Growing group of extended spectrum β -lactamases: The CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:1-14.
- Navarro F. Acquisition and horizontal diffusion of β -lactam resistance among clinically relevant microorganisms. *Int Microbiol.* 2006;9:79-81.
- Oteo J, Navarro C, Cercenado E, Delgado-Iribarren A, Wilhelmi I, Orden B, et al. Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and cef-tazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J Clin Microbiol.* 2006;44:2359-66.
- Woodford N, Ward M, Kaufmann M, Turton J, Fagan E, James D, et al. Community and hospital spread *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum β -lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54:735-43.
- Oteo J, Campos J, Baquero F. Antibiotic resistance in 1962 invasive isolates of *Escherichia coli* in 27 Spanish hospitals participating in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2001). *J Antimicrob Chemother.* 2002;50:945-52.
- Hernández J, Pascual A, Cantón R, Martínez L. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003;21:77-82.
- Oteo J, Lázaro E, de Abajo F, Baquero F, Campos J, and Spanish EARSS Group. Antimicrobial-resistant invasive *Escherichia coli*, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:546-53.
- Cantón R, Coque T. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9:466-75.
- Hernández J, Martínez L, Cantón R, Coque M, Pascual A, Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). Nation-wide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2121-5.
- Romero L, López L, Rodríguez J, Hernández J, Martínez L, Pascual A. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11:625.
- Miró E, Mirelis B, Navarro F, Rivera A, Mesa R. Surveillance of extended spectrum β -lactamases from clinical samples and faecal carriers in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56:1152-5.
- Valverde A, Coque T, Sánchez-Moreno M, Rollán A, Baquero F, Cantón R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol.* 2004;42:4769-75.
- Oliver A, Coque T, Alonso D, Valverde A, Baquero F, Cantón R. CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among *Enterobacteriaceae* in a Spanish hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:1567-71.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 14th informational supplement (M100-S14). Wayne, PA: NCCLS; 2004.
- Tenover F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen P, Murray B, Persing D, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2233-9.
- Horcajada J, Vila J, Moreno-Martínez A, Ruiz J, Martínez J, Sánchez M, et al. Molecular epidemiology and evolution of resistance to quinolones in *Escherichia coli* after prolonged administration of ciprofloxacin in patients with prostatitis. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49:55-9.
- Sabaté M, Miró E, Navarro F, Verges C, Aliaga R, Mirelis B, et al. β -lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). *J Antimicrob Chemother.* 2002;49:989-97.
- Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2000.
- Grigoryan L, Haaijer-Rysjamp F, Burgerhof J, Mechtler R, Deschepper R, Tambic-Andrasevic A, et al. Self-medication with antimicrobial drugs in Europe. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:452-9.
- DiPersio J, Deshpande L, Biedenbach D, Toleman A, Walsh R, Jones R. Evolution and dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology and molecular report from the SENTRY. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;51:1-7.
- Livermore D, Cantón R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini G, Arlet G, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:165-74.
- Cantón R, Oliver A, Coque T, Varela M, Pérez-Díaz J, Baquero F. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacter isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1237-43.
- Bou G, Cartelle M, Tomas M, Canle D, Molina F, Moure R, et al. Identification and broad dissemination of the CTX-M-14 β -lactamase in different *Escherichia coli* strains in the Northwest area of Spain. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4030-6.
- Coque T, Oliver A, Pérez-Díaz J, Baquero F, Cantón R. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum β -lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:500-10.
- Mena A, Plasencia V, García L, Hidalgo O, Ayestarán J, Alberti S, et al. Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. *J Clin Microbiol.* 2006;44:2831-7.

6.2 ANEXO 2

Diestra, K., C. Juan, T. Curiao, B. Moyá, E. Miró, J. Oteo, M. Coque, M. Pérez-Vásquez, J. Campos, R. Cantón, A. Oliver and F. Navarro. Characterization of plasmids encoding *bla*_{ESBL} and surrounding genes in Spanish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63: 60-6.

- *Factor de Impacto* : 4,352

- *Nº Citas*: 10

Characterization of plasmids encoding *bla*_{ESBL} and surrounding genes in Spanish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*

Karol Diestra^{1,2}, Carlos Juan³, Tânia Curiao^{4,5}, Bartolomé Moyá³, Elisenda Miró¹, Jesús Oteo⁶, Teresa M. Coque^{4,5,7}, María Pérez-Vázquez⁶, José Campos⁶, Rafael Cantón^{4,5,7}, Antonio Oliver³ and Ferran Navarro^{1,2*} on behalf of Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Spain

¹Servicio de Microbiología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; ²Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Spain; ³Servicio de Microbiología, Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca, Spain; ⁴Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain; ⁵CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain; ⁶Laboratorio de Antibióticos, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ⁷Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana Asociada al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain

Received 22 August 2008; returned 15 September 2008; revised 3 October 2008; accepted 7 October 2008

Objectives: The aim of the study was to characterize plasmids that harbour *bla*_{ESBL} genes and their genetic environment in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clones circulating in Spain.

Methods: The incompatibility group of plasmids within 58 strains harbouring *bla*_{CTX-M} ($n = 45$) and *bla*_{SHV} ($n = 15$) genes was determined by rep-typing-PCR and hybridization. The *bla*_{ESBL} genetic environment was determined by PCR and sequencing.

Results: The *bla*_{CTX-M-9} genes ($n = 14$) were linked to Inc60 located in Inc11 (50%) or IncH12 plasmids (28%). All *bla*_{CTX-M-14} genes ($n = 13$) were flanked by *ISEcp1* and *IS903* and 12 were associated with IncK plasmids. One of two *bla*_{CTX-M-10} genes was present in an IncK plasmid, but both genes were linked to a phage-related element. Five of seven *bla*_{CTX-M-1} (71%), all three *bla*_{CTX-M-32} and one of two *bla*_{CTX-M-3} genes were linked to IncN plasmids. The other *bla*_{CTX-M-3} gene was linked to IncA/C and the remaining two *bla*_{CTX-M-1} genes to IncFII plasmids. Three *bla*_{CTX-M-15} genes were associated with IncF (repFIA) and one with IncFII plasmids. All these genes from *bla*_{CTX-M} group-1 showed the *ISEcp1* upstream truncated by different insertion sequences. Forty-three percent of *bla*_{SHV-12} genes ($n = 14$) were located in Inc11 plasmids, all flanked by the *IS26* and DEOR region. The only detected *bla*_{SHV-5} gene was located in an IncFII plasmid and flanked by *recF* and DEOR regions.

Conclusions: A diversity of the plasmid incompatibility groups that harbour *bla*_{ESBL} genes was observed, except for the *bla*_{CTX-M-14} gene. Moreover, a high variability was confirmed in the genetic environment of these genes as a result of insertion and deletion events.

Keywords: ESBL-producing, incompatibility group, antimicrobial resistance surveillance, mechanisms of resistance

*Correspondence address. Servicio de Microbiología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain. Tel: +34-932919071; Fax: +34-932919070; E-mail: fnavaror@santpau.cat

Characterization of plasmids encoding *bla*_{ESBL} genes

Introduction

Distribution and prevalence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) have changed dramatically in recent years. This process could have been influenced by the massive use of certain antibiotics; however, others factors must also be taken into account. The association of *bla*_{ESBL} genes with genetic elements, which potentially facilitate the capture and expression of *bla*_{CTX-M} genes as integrons or insertion sequences, including *ISEcp1*, *ISCR1* or *IS26*, might also have played a role.¹ It has been well-documented in several studies that the spread, in general, is not only due to the expansion of a clonal strain, but also to plasmid dissemination.^{2–5}

In our previous study,⁶ a great clonal diversity among the *Escherichia coli* strains collected in 2004 was observed, the predominant ESBL being CTX-M-14 followed by CTX-M-9 and SHV-12. Regarding *Klebsiella pneumoniae* strains, a lower clonal diversity was observed but with higher diversity of the enzymes including CTX-M-type (CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-15), SHV-type (SHV-12 and SHV-5) and TEM-4. Three clusters included 53.1% of strains. The high clonal diversity of ESBL producers could be due to the presence of *bla*_{ESBL} genes in plasmids and further dissemination in different *E. coli* and *K. pneumoniae* clones. The identification of the plasmid incompatibility group and the characterization of the surrounding regions of *bla*_{ESBL} genes enable the tracking of the genes' mobility.

Materials and methods

Isolates

From a collection of 92 *E. coli* and 32 *K. pneumoniae* isolates recovered from 11 Spanish hospitals over the first 3 months of 2004 during a nationwide survey within the Spanish Network in Infectious Pathology Project,⁶ we selected 58 representative strains (see below) carrying different ESBL of the families CTX-M ($n = 45$: 14 CTX-M-9, 13 CTX-M-14, 7 CTX-M-1, 4 CTX-M-15, 3 CTX-M-32, 2 CTX-M-3 and 2 CTX-M-10) and SHV ($n = 15$: 14 SHV-12 and 1 SHV-5). Two strains had both CTX-M-9 and SHV-12 enzymes. Only one isolate per clone was selected. Clonality was studied in the previously mentioned study.⁶

Genetic environment characterization

The genetic context of *bla*_{ESBL} was investigated by searching for the presence and linkage with sequences previously reported to be associated with the CTX-M group genes, such as *ISEcp1*, *IS903*, *IS26*, *ISCR1* or *orf1005*. PCR and sequencing using previously described primers were employed to investigate these surrounding regions.^{1,2,7} Additionally, primers designed in accordance with accessible DNA sequences in the GenBank (EF370423, AY532647, AJ245670) were used to ascertain the presence of genes linked to the SHV group (Table 1). For strains showing negative PCR results, the corresponding *bla*_{ESBL} genes were cloned in order to investigate their surrounding regions. For this purpose, plasmid DNA of each strain [obtained with the QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany)] was digested with *Bam*HI, *Eco*RI or *Hind*III and further ligated to pBGS18 digested with the same enzyme. Obtained products were then transformed into XL1 Blue *E. coli* strain made competent by CaCl₂. Transformants were selected in 1 mg/L

cefotaxime–30 mg/L kanamycin LB agar plates. After checking plasmid DNA from the transformants for the presence of the corresponding ESBL gene in the cloned DNA fragments, the surrounding regions were sequenced using reverse *bla*_{ESBL} primers (Table 1).

Characterization of plasmids carrying ESBL

The present study included 24 wild-type strains (15 *E. coli* and 9 *K. pneumoniae*) and 34 transconjugants (26 *E. coli* and 8 *K. pneumoniae*). The latter were obtained using *E. coli* HB101 kanamycin-azide-resistant strain as recipient.²

In all 58 strains, the incompatibility group of plasmids carrying *bla*_{ESBL} genes was determined by a PCR-based method as described previously.⁸ Plasmid profiles of the transconjugants and wild-type strains were determined by PFGE of S1 nuclease digested genomic DNA. PFGE was performed on a CHEF DRIII apparatus (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany) using a run time of 24 h, 14°C, 120° of angle and a 6 V/cm of voltage, with initial and final switch times of 5–25 s for 6 h and 30–45 s for 18 h. Lambda ladder (New England Biolabs, Ipswich, USA) was used as a marker. Gels were transferred by Southern blot, and the membranes obtained were hybridized with probes specific for *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} and rep sequences. We used the amplified replicons as probes. Probe labelling, hybridization and detection were performed with the ECL kit (GE Healthcare Amersham ECLTM, Buckinghamshire, UK) as described previously.²

Results and discussion

As mentioned earlier, the 58 studied strains were selected from a collection of 92 *E. coli* and 32 *K. pneumoniae* isolates recovered from 11 Spanish hospitals over a trimester of 2004.⁶ This study showed a higher diversity of ESBL-types in both *E. coli* and *K. pneumoniae* than that observed in a previous epidemiological study performed in 2000 in Spain,⁶ in which the most predominant ESBL were CTX-M-9 (27.3%), SHV-12 (23.9%) and CTX-M-14 (20.5%) for *E. coli*, and TEM-3 (16.7%) and TEM-4 (25%) for *K. pneumoniae*. The corresponding enzymes in the 2004 study⁶ were CTX-M-14 (45.7%), SHV-12 (21.7%) and CTX-M-9 (20.6%) for *E. coli* and CTX-M-1 (31.3%), CTX-M-9 (21.9%) and SHV-12 (28.1%) for *K. pneumoniae*. Moreover, there were no epidemiological relationships or evidence of clonality among the ESBL-producing *E. coli* isolates, although clonal relationships were observed among some *K. pneumoniae* isolates.⁶ This suggests, as previously stated by other authors,¹ that plasmids and/or mobile elements could be involved in the spread of *bla*_{ESBL} genes. To ascertain this possibility, characterization of plasmids carrying these genes and their corresponding genetic environment were performed from 34 transconjugants and 25 wild-type isolates. Table 2 and Figure 1 summarize the results obtained from all these strains.

The 14 *bla*_{CTX-M-9} genes detected in different clones were located in plasmids of the incompatibility groups IncI1 ($n = 7$; 50%), IncHI2 ($n = 4$; 28.5%), IncP ($n = 3$; 21.4%), IncF (repFIB) ($n = 2$; 14.3%) and IncK ($n = 1$; 7.1%), highlighting the presence of replicons corresponding to IncI1 and IncP plasmids in the same plasmid in three cases. The only four IncHI2 plasmids containing *bla*_{CTX-M-9} were isolated from three hospitals from Barcelona, and no other IncHI2 plasmids associated with the other *bla*_{ESBL} genes were detected. The plasmids' association between IncI1 or IncHI2 plasmids and *bla*_{CTX-M-9}

Table 1. Primers used to characterize the *bla*_{ESBL} genetic environments

Primer	Sequence (5' → 3')	Amplicon size (kb)	Use and notes	Reference or source
PCRs for <i>bla</i>_{CTX-M-9} surrounding regions				
341 A	CGCCCACTCAAACAAACG	2.7	PCR of <i>bla</i> _{CTX-M-9} immediately upstream region (<i>orf513</i>)	2
ISTOP	ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC			
ISTOP-R	GGCTTCAGCGGCGAGAATCAT	2.1	PCR of <i>bla</i> _{CTX-M-9} immediately downstream region	2
03000SR	GGAGCTTATGCGCTCAATCG		(beginning of IS3000)	
785.S2	AAGCGGTCATAATCGGGG	3	PCR of <i>bla</i> _{CTX-M-9} following downstream region (<i>orf1005</i>)	2
51.10A	CGATCGCTAAAAGCCTCC			
PCRs for <i>bla</i>_{CTX-M-14} surrounding regions				
B3A	AACGGCACAATGACGCTGGC	0.9	PCR of <i>bla</i> _{CTX-M-14} immediately downstream region	10
IS903	TGTAATCCGGGCAGCGTA		(IS903)	
ISEcpUP	CAAATGATCCCCTCGTC	1.6	PCR of <i>bla</i> _{CTX-M-14} immediately upstream region (<i>ISEcp1</i>)	1
CTX-M-9-R1	CCAGCGTCATTGTGCCG			
PCRs for <i>bla</i>_{CTX-M-1} group surrounding regions				
ISEcpUP	CAAATGATCCCCTCGTC	variable (1.35–2.7)	PCR and sequencing of <i>ISEcp1</i> (immediately <i>bla</i> _{CTX-M} upstream region)	1
CTX-M-1RCJ	AGCGGCACACTTCCTAAC			this work, based on GenBank sequence NC_004464
IS26-FCJ (PCR with CTX-M-1RCJ)	CATTTCAAAACTCTGCTTAC	variable (0.8–1)	PCR and sequencing of IS26 truncating <i>ISEcp1</i> at different positions, upstream of <i>bla</i> _{CTX-M}	this work, based on GenBank sequence EU534207
PCRs for <i>bla</i>_{CTX-M-10} surrounding regions				
RYCE21-F3	CCCATGAGCCCCTTACG	1.1	PCR and sequencing of the phage related invertase	7
RYCE21-R3	GAGCCACAAAAGTGTAGCGC		immediately upstream of <i>bla</i> _{CTX-M-10}	
PCRs for <i>bla</i>_{SHV} surrounding regions				
IS26-FCJ	CATTTCAAAACTCTGCTTAC	0.85	PCR and sequencing of IS26, immediately upstream of <i>bla</i> _{SHV-12}	this work, based on GenBank sequence EU534207
SHV-12-F-I	TACACAGGCGAATATAACGC			
SHV-12-R-I	GATCGAGCACTGGCAACG	0.8	PCR and sequencing of putative DEOR regulator, immediately downstream of <i>bla</i> _{SHV-12} and <i>bla</i> _{SHV-5}	this work, based on GenBank sequence EU534207
DEOR-R	TGATTCCAATAGAACGACATC			
RECF-F (PCR with SHV-12-F-I)	TCCCGCACTCGCGATAC	1.2	PCR and sequencing of putative <i>recF</i> , immediately upstream of <i>bla</i> _{SHV-5}	this work, based on GenBank sequence AY532647
Primers used only for sequencing				
<i>ISEcp1</i> -intF	ATGCTGAAAACATATCAAAG	—	sequencing of <i>ISEcp1</i> and inserted sequences	this work, based on GenBank sequence NC_004464
<i>ISEcp1</i> -intRCJ	GGCTTCTTTGATATAGTTTTC	—	sequencing of <i>ISEcp1</i> and inserted sequences	this work, based on GenBank sequence NC_004464
IS26-intF	CAGTGCGGCCCCGGC	—	sequencing of IS26 and inserted sequences	this work, based on GenBank sequence EU534207
IS26-iniciF	CGGCCTTTGAATGGGTTTC	—	sequencing of IS26 and inserted sequences	this work, based on GenBank sequence EU534207

Characterization of plasmids encoding *bla*_{ESBL} genes

Table 2. Characterization of Inc group plasmids carrying *bla*_{ESBL} from Spain

<i>bla</i> _{ESBL}	Microorganism	<i>n</i> ^a	Inc group	Approximate size of plasmid (kb)
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>E. coli</i>	2	N	130
	<i>K. pneumoniae</i>	3	N	48
		2	FII	22
<i>bla</i> _{CTX-M-3}	<i>E. coli</i>	1	N	50
		1	A/C	40
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>E. coli</i>	6 ^b	I1	90–100
		1	HI2	340
		2	FIB	120
		1	K	90
	<i>K. pneumoniae</i>	1 ^c	I1	90
3		HI2	200	
<i>bla</i> _{CTX-M-10}	<i>E. coli</i>	1	K	90
		1	— ^d	—
<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>E. coli</i>	12	K	85–90
		1	— ^d	—
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>E. coli</i>	2	FIA	160
		1	FII	160
	<i>K. pneumoniae</i>	1	FIA	210
<i>bla</i> _{CTX-M-32}	<i>E. coli</i>	3	N	60–185
<i>bla</i> _{SHV-12}	<i>E. coli</i>	3	I1	120
		4	K	90
		1	HI2	340
		1	— ^d	—
	<i>K. pneumoniae</i>	3	I1	90–220
		1	FII	160
	1	K	55	
<i>bla</i> _{SHV-5}	<i>K. pneumoniae</i>	1	FII	160

^a*n*, number of isolates.

^bTwo strains present IncI1 and IncP.

^cThe strain presents IncI1 and IncP.

^dNot found.

observed in this study has already been described in our country and highlights the persistence of this association.^{4,9,10} The analysis of the genetic environment revealed that *bla*_{CTX-M-9} genes were associated with In60 related integrons, but a great diversity within this element was observed in agreement with previous Spanish studies.² Variations were mainly related to deletions within the upstream region (*ISCR1*). In our study, one strain did not contain the *ISCR1* and *orf1005* genes upstream and downstream of *bla*_{CTX-M-9}, respectively; five strains did not contain the *orf1005* gene downstream and eight strains contained both genes (Figure 1).

It is noteworthy that, with the exception of one *bla*_{CTX-M-14} gene in which it was not possible to determine the incompatibility group, all were associated with IncK plasmids. This close association between *bla*_{CTX-M-14} and IncK plasmid has also been previously documented in different studies from single institutions.^{9,10} Moreover, the surrounding regions of *bla*_{CTX-M-14} were also highly conserved. *ISEcp1* was found upstream and

IS903 downstream of the gene, as has been documented previously (Figure 1).^{1,3}

The seven *bla*_{CTX-M-1} genes were located in plasmids of IncN (*n* = 5; 71.4%) and IncFII (*n* = 2; 28.6%). All three *bla*_{CTX-M-32} genes were also found in IncN plasmids. The 3' region of the *ISEcp1* insertion sequence truncated by IS26 was found 80 bp upstream in all seven *bla*_{CTX-M-1} genes. IS26 was inserted in these seven strains in the same position (at nucleotide 214 from the end of *ISEcp1*), but a 74 bp duplication of the beginning of the IS26 transposase was observed in five of them (Figure 1). Moreover, in these five strains (in contrast to the other two strains), IS26 was preceded by two genes (DNA invertase *invA* and *orf10*) showing 100% identity to those detected in a *Comamonas acidovorans* strain DNA sequence (AB063332). Similar to *bla*_{CTX-M-1} genes, all three *bla*_{CTX-M-32} environments showed *ISEcp1* at 80 bp upstream of the gene (with identical nucleotide sequence), but truncated by IS5 instead of IS26, and in a different position (at nucleotide 152 from the end of *ISEcp1*) (Figure 1). The location of both *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTX-M-32} genes on related broad-host-range IncN plasmids has also been described in Madrid hospitals.³ This emphasizes the relevance of the evolution of *bla*_{ESBL} genes within specific genetic environments, as has also been suggested for *bla*_{CTX-M-14} and *bla*_{CTX-M-9}.¹⁰

Among *bla*_{CTX-M-3} (*n* = 2), one was located in an IncN plasmid, 48 bp downstream of *ISEcp1* truncated by IS26, similar to two of the *bla*_{CTX-M-1} environment. The other one was located in the IncA/C plasmid, 45 bp downstream of *ISEcp1* (Figure 1). Plasmids from the IncA/C group seem to be widely spread as they have been detected in CTX-M-2, TEM-24 or CMY-producing isolates from different European and/or American countries.³

Three *bla*_{CTX-M-15} genes were located in IncF (repFIA) and one in IncFII plasmids. Different recent studies have pointed out that pandemic dissemination of CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae is linked to epidemic *E. coli* B2 strain and/or epidemic IncFII plasmids, although association with IncFI plasmids has recently been described.^{3,5,9,11} It is noteworthy that the four *E. coli* carrying *bla*_{CTX-M-15} genes were not clonally related.⁶ Regarding the *bla*_{CTX-M-15} environment, the right boundary of *ISEcp1* was located 48 bp upstream of the gene in all cases, as already described in Spanish, French, Indian and Turkish isolates.^{1,3,5} One strain had *ISEcp1* truncated by an IS26 at nucleotide 24 from the end of *ISEcp1* (Figure 1). Thus, *ISEcp1* was always found upstream of *bla*_{CTX-M} coding for CTX-M-1-like enzymes (*bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-32}) and is strongly implicated in the mobilization of this antibiotic resistance gene.¹

One of the two *bla*_{CTX-M-10} genes was located in the IncK plasmid, but it was not possible to determine the incompatibility group of the other one. As described previously,⁷ a gene encoding a phage-related DNA invertase was detected in the two strains upstream of the *bla* gene (Figure 1), suggesting the mobilization of *bla*_{CTX-M-10} to a transferable plasmid may have been mediated by transduction.

Twelve of the 14 *bla*_{SHV-12} genes were located in IncI1 (*n* = 6, 42.9%), IncK (*n* = 5, 35.7%) and IncFII plasmid (*n* = 1, 7.1%). The two remaining strains simultaneously carried the *bla*_{SHV-12} and the *bla*_{CTX-M-9} gene. In one of them, both genes were located in the same plasmid, the IncHI2 plasmid (*n* = 1, 7.1%), but it was not possible to determine the incompatibility

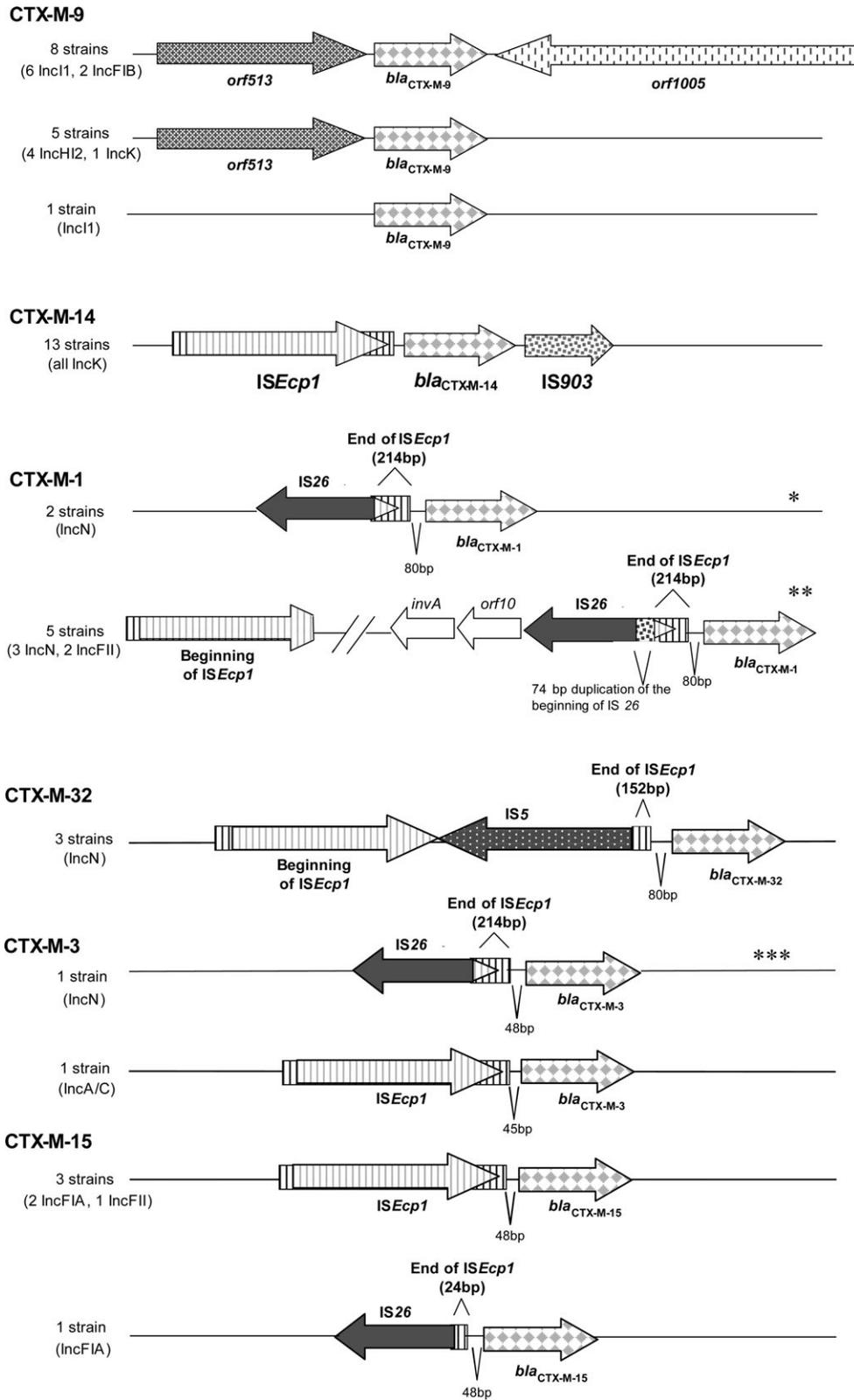


Figure 1. Representation of the genetic environment of *bla*_{ESBL} genes from the 59 clinical isolates producing CTX-M-type and SHV-type β-lactamases. Filled arrows indicate the genes detected by PCR and sequencing. The new structures detected, deposited in the GenBank database under the accession numbers FJ235692, FJ235693 and FJ235691, are indicated in by *, ** and ***, respectively.

Characterization of plasmids encoding *bla*_{ESBL} genes

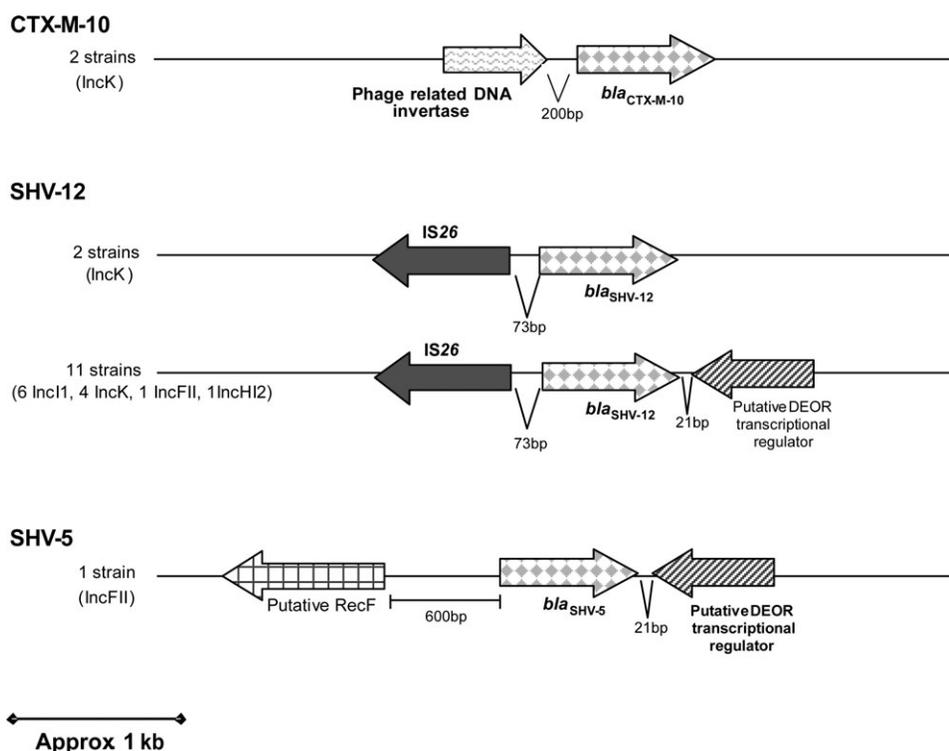


Figure 1. Continued

group of the other one. These results are in agreement with another study that correlated *bla*_{SHV-12} with a diversity of IncFII, IncI1 and IncA/C plasmids.⁸ IS26 was found 73 bp upstream of the *bla*_{SHV-12} gene in all cases. In all but two SHV-12-producing strains, the putative DEOR transcriptional regulator (GenBank EF370423) was identified 21 bp downstream of the *bla*_{SHV-12} gene.

The *bla*_{SHV-5} gene was located in IncFII plasmid and its environment was surrounded by a gene encoding a putative RecF protein (GenBank AY532647) upstream and the gene coding the putative DEOR transcriptional regulator downstream (Figure 1).

In conclusion, our study highlights circulation of different plasmids containing a diversity of *bla*_{ESBL} genes associated with different genetic environments in Spain. The diversity of genetic contexts found for particular *bla* genes located in specific plasmids suggests the evolution of these plasmids by different recombinatorial events.

Acknowledgements

We are grateful to the participants in this project for their help during the collection of the isolates: L. Matas and M. Giménez (Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona), I. Sanfeliu (Corporació Hospitalària Parc Taulí, Sabadell), G. Prats (Hospital Vall d'Hebron, Barcelona), M. Ruíz and J. Vila (Hospital Clínic, Barcelona), A. Domínguez (Hospital de Bellvitge, Hospitalet), A. Guerrero and J. Colomina (Hospital de La Ribera, Alzira), A. Pascual (Hospital Virgen de la Macarena, Sevilla) and J. Aznar (Hospital Virgen del Rocío, Sevilla).

Funding

This study was partially supported by grants FIS PI04339, PI040162, PI040837 and PI042012, by AGAUR 2006FI00426 and also by Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III - FEDER, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases REIPI C03/14 and Spanish Network for Research in Infectious Diseases REIPI RD06/0008.

Transparency declarations

None to declare.

References

1. Lartigue M, Poirel L, Nordmann P. Diversity of genetic environment of *bla*_{CTX-M} genes. *FEMS Microbiol Lett* 2004; **234**: 201–7.
2. García A, Navarro F, Miró E *et al*. Characterisation of the highly variable region surrounding the *bla*_{CTX-M-9} gene in non-related *Escherichia coli* from Barcelona. *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**: 819–26.
3. Novais A, Cantón R, Moreira R *et al*. Emergence and dissemination of Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 796–9.
4. García A, Navarro F, Miró E *et al*. Acquisition and diffusion of *bla*_{CTX-M-9} gene by R478-IncHI2 derivative plasmids. *FEMS Microbiol Lett* 2007; **271**: 71–7.
5. Coque TM, Novais A, Carattoli A *et al*. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis* 2008; **14**: 195–200.

6. Diestra K, Coque TM, Miró E *et al.* Caracterización y epidemiología molecular de BLEE en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en 11 hospitales españoles. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; **26**: 404–10.
7. Oliver A, Coque TM, Alonso D *et al.* CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among *Enterobacteriaceae* in a Spanish hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 1567–71.
8. Carattoli A, Miriagou V, Bertini A *et al.* Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer β -lactams. *Emerg Infect Dis* 2006; **12**: 1145–8.
9. Hopkins KL, Liebana E, Villa L *et al.* Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY β -lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 3203–6.
10. Navarro F, Mesa RJ, Miró E *et al.* Evidence for convergent evolution of CTX-M-14 ESBL in *Escherichia coli* and its prevalence. *FEMS Microbiol Lett* 2007; **273**: 120–3.
11. Gonullu N, Aktas Z, Kayacan CB *et al.* Dissemination of CTX-M-15 β -lactamase genes carried on Inc FI and FII plasmids among clinical isolates of *Escherichia coli* in a University Hospital in Istanbul, Turkey. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 1110–2.

6.3 ANEXO 3

Oteo, J., K. Diestra, C. Juan, V. Bautista, A. Novais, M. Pérez-Vásquez, B. Moyá, E. Miró, M. Coque, A. Oliver, R. Cantón, F. Navarro, J. Campos and Spanish Network in Infectious Pathology Project (REIPI). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 34: 173-76.

- *Factor de Impacto* : 3,032

- *Nº Citas*: 13

Short communication

Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2

Jesús Oteo^a, Karol Diestra^b, Carlos Juan^c, Verónica Bautista^a, Ângela Novais^d, María Pérez-Vázquez^a, Bartolome Moyá^c, Elisenda Miró^b, Teresa M. Coque^d, Antonio Oliver^c, Rafael Cantón^d, Ferran Navarro^b, José Campos^{a,e,*}, Spanish Network in Infectious Pathology Project (REIPI)

^a Laboratorio de Antibióticos, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^b Servicio de Microbiología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

^c Servicio de Microbiología, Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca, Spain

^d Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP) and Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana Asociada al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain

^e Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 January 2009

Accepted 3 March 2009

Keywords:

ESBL

MLST

Escherichia coli

Phylogenetic group

ABSTRACT

In this study, we investigated the population structure of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in Spain and determined possible associations between specific multilocus sequence typing (MLST) types and ESBL types. Ninety-two ESBL-producing *E. coli* isolates from 11 Spanish hospitals were studied. The predominant ESBLs in this collection were CTX-M-14 (45.7%), SHV-12 (21.7%) and CTX-M-9 (20.6%). Phylogenetic groups and MLST types were studied. Thirty-seven isolates (40.2%) belonged to phylogroup A, 26 (28.3%) to group B1, 13 (14.1%) to group B2 and 16 (17.4%) to group D. Fifty-six sequence types (STs) were identified, but ST131 (eight isolates) and ST167 (five isolates) were the most prevalent. The most common ST complexes were ST10 (13 isolates; 14.3%) and ST23 (10 isolates; 11%). *Escherichia coli* ST131 carried six different ESBLs (CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-10, CTX-M-14, CTX-M-15 and SHV-12), *E. coli* ST10 complex carried five ESBLs and *E. coli* ST23 complex carried four ESBLs. A great diversity of MLST types was observed among Spanish ESBL-producing *E. coli* isolates.

© 2009 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Most European countries have experienced a recent rapid dissemination of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates, in particular CTX-M-type [1,2]. In Spanish invasive *E. coli* isolates, ESBL production increased from 1.6% in 2001 to 7% in 2007 (European Antimicrobial Resistance Surveillance System; <http://www.rivm.nl/earss/>). Although the spread of ESBLs is frequently due to the dissemination of mobile genetic elements [2–4], clonal dissemination of CTX-M-15-producing *E. coli* belonging to phylogenetic group B2 and ST131 has been addressed in different countries [5–8]. In addition, clonal spread of the CTX-M-9-group-producing ST38 strain has been described in a recent study in Japan [9]. The various methods by which ESBLs spread

greatly influence the prevalence of different enzymes in specific areas.

Multilocus sequence typing (MLST) is expensive and time consuming, and almost all studies that characterise the population structure of ESBL-producing *E. coli* have selected the study population by some other criteria, such as serotyping [9] or production of specific ESBLs, e.g. CTX-M-15 [5,8]. As this approach may produce biased results, we sought to investigate the population genetics of *E. coli* carrying a variety of ESBLs without any previous selection.

Our study aimed to determine (i) the population structure of ESBL-producing *E. coli* in Spain and (ii) the possible association between specific MLST types and ESBL types. To attain these objectives, the population structure of a large, well-characterised collection of 92 ESBL-producing *E. coli* isolates collected during a Spanish survey [10] was characterised.

2. Material and methods

A collection of 92 ESBL-producing *E. coli* isolates was recovered from clinical samples (68.5% from urine) from 11 Spanish hospitals

* Corresponding author. Present address: Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Carretera Pozuelo a Majadahonda, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain.

in five geographic regions (Andalucía, Cataluña, Madrid, Baleares and Valencia). All hospitals were members of the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI) [10]. Participant hospitals were asked to collect up to 15 consecutive, non-duplicate (one isolate per patient) ESBL-producing *E. coli* isolates by the first quarter of 2004. Eight different ESBL types were identified, with the predominant types being CTX-M-14 (45.7%), SHV-12 (21.7%) and CTX-M-9 (20.6%), as described previously [10]. In addition, the plasmids encoding *bla*_{ESBL} and the corresponding surrounding genes in selected isolates were further characterised [11].

In the present study, MLST types and phylogenetic groups of the ESBL-producing *E. coli* were analysed. Phylogenetic groups were determined by a multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay as described by Clermont et al. [12]. Analysis of two genes (*chuA* and *yjaA*) and an anonymous DNA fragment (TSPE4.C2) allowed the identification of the four major phylogenetic groups of *E. coli*.

MLST determinations were carried out according to the Max-Planck Institute scheme for *E. coli* developed by M. Achtman et al. (<http://web.mpiib-berlin.mpg.de>). The phylogenetic relationships among the different sequence types (STs) found in this study were established according to the eBURST program version 2 (<http://linux.mlst.net/burst.htm>). STs of all *E. coli* isolates from the MLST database as well as STs of ESBL-producing *E. coli* from this study were considered together and introduced into the eBURST for analysis and elaboration of a population snapshot (Fig. 1).

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 3.02 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

3. Results

3.1. Phylogenetic groups

Of the 92 ESBL-producing *E. coli* isolates, 37 (40.2%) belonged to phylogenetic group A, 26 (28.3%) to group B1, 13 (14.1%) to group B2 and 16 (17.4%) to group D. Seven different ESBL types were found among *E. coli* phylogroup A isolates, four among phylogroup B1 isolates, six among phylogroup B2 isolates and three among phylogroup D isolates.

Escherichia coli producing the three most prevalent ESBL types (CTX-M-14, CTX-M-9 and SHV-12) were distributed among all four

phylogroups, with CTX-M-14-producing isolates being the most prevalent in all of them. Of the three CTX-M-15-producing isolates, two were phylogroup B2 and one was phylogroup A.

3.2. MLST analysis

Among the 91 isolates tested (1 isolate could not be sequenced), 56 different STs were identified. The most prevalent STs were ST131 (eight isolates), ST167 (five isolates), ST23 (four isolates), ST602 (four isolates) and ST359 (four isolates) (Fig. 1; Table 1). The ST131 isolates were recovered from different geographic locations: Barcelona (four isolates from three different hospitals); Madrid (three isolates from one hospital); and Seville (one isolate).

By eBURST, 33 STs were distributed into 15 different ST complexes (53 isolates), whilst 23 STs were considered singletons (38 isolates) (Table 1). The two main ST complexes were ST10 (13 isolates; 14.3%) and ST23 (10 isolates; 11%). Five of the eight most frequent STs, including ST131, were singletons (Table 1).

Analysis with eBURST provided an overview of STs of the Spanish ESBL-producing *E. coli* isolates from this study compared with all *E. coli* isolates from the MLST database. The major ST complexes found are represented in Fig. 1. ST10 complex was the most commonly detected in this study (14.3%) and is also the most frequent ST in the MLST database (9.4%).

3.3. Sequence type distribution in relation to extended-spectrum β -lactamase types

The Spanish ESBL-producing *E. coli* were distributed among a large number of MLST types (Table 1). The CTX-M-14-producers were distributed into 12 different ST complexes (28 isolates) and 10 singletons (13 isolates) (Table 1). The SHV-12-producers alone were distributed among six ST complexes (11 isolates) and 7 singletons (7 isolates) (Table 1). The CTX-M-9-producers alone were distributed among four ST complexes (8 isolates) and 7 singletons (9 isolates) (Table 1).

Escherichia coli ST131 isolates carried six different ESBLs: CTX-M-9; CTX-M-10; CTX-M-1; CTX-M-14; CTX-M-15; and SHV-12. In addition, *E. coli* isolates belonging to the two major complexes, ST10 and ST23, had five and four ESBL types, respectively.

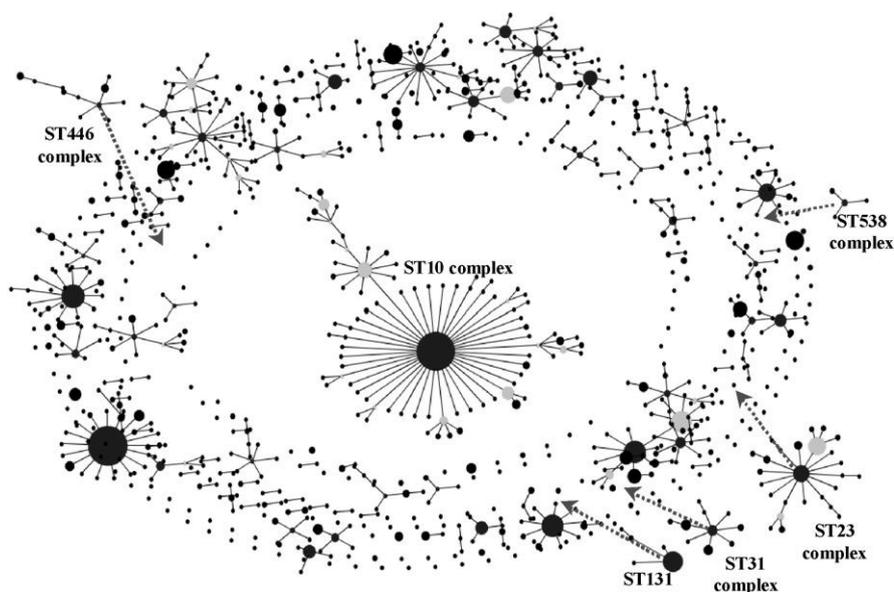


Fig. 1. Population snapshot of sequence types (STs) of all *Escherichia coli* isolates from the multilocus sequence typing (MLST) database and STs of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *E. coli* from this study considered altogether. The most important ST complexes found in this study (ST10 complex, ST23 complex, ST31 complex, ST131, ST446 complex and ST538 complex) are emphasised.

Table 1

Distribution of sequence type (ST) and phylogenetic groups among 91 extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates in relation to ESBL type.

ESBL (n)	ST complex (n)	ST ^a (phylogenetic group)	
CTX-M-14 (41)	ST23 (6)	23 ² (A); 88 ¹ (A); 410 ¹ (A); 612 ¹ (A); 650 ¹ (A)	
	ST10 (4)	617 ² (A); 48 ¹ (A); 167 ¹ (A)	
	ST31 (3)	130 ¹ (D); 393 ¹ (D); 613 ¹ (D)	
	ST538 (3)	538 ² (D); 620 ¹ (B2)	
	ST46 (2)	615 ² (A)	
	ST101 (2)	101 ¹ (B1); 619 ¹ (B1)	
	ST155 (2)	616 ¹ (B1); 621 ¹ (B1)	
	ST156 (2)	348 ¹ (B1); 611 ¹ (B1)	
	ST38 (1)	38 ¹ (D)	
	ST69 (1)	69 ¹ (D)	
	ST350 (1)	57 ¹ (A)	
	ST354 (1)	623 ¹ (B2)	
	Singletons (13)	359 ³ (B1); 224 ² (B1); 131 ¹ (B2); 196 ¹ (B1); 610 ¹ (B1); 614 ¹ (A); 622 ¹ (B2); 624 ¹ (D); 625 ¹ (B2); 649 ¹ (B1)	
	SHV-12 (18)	ST10 (4)	167 ² (A); 10 ¹ (A); 227 ¹ (A)
		ST23 (2)	23 ² (A)
ST168 (2)		93 ² (A)	
ST101 (1)		604 ¹ (B1)	
ST350 (1)		57 ¹ (D)	
ST354 (1)		354 ¹ (D)	
Singletons (7)		117 ¹ (D); 127 ¹ (D); 131 ¹ (B2); 224 ¹ (B1); 297 ¹ (B1); 605 ¹ (A); 608 ¹ (A)	
CTX-M-9 (17)		ST446 (4)	602 ⁴ (B1)
	ST10 (2)	193 ² (A)	
	ST59 (1)	59 ¹ (D)	
	ST156 (1)	156 ¹ (B1)	
	Singletons (9)	117 ² (D); 131 ² (B2, D); 359 ¹ (B1); 401 ¹ (A); 600 ¹ (B1); 606 ¹ (B1); 607 ¹ (A)	
	Other ESBL (15) ^b	ST10 (3)	167 ² (A); 10 ¹ (A)
ST23 (2)		88 ¹ (A); 410 ¹ (A)	
ST46 (1)		609 ¹ (A)	
Singletons (9)		131 ⁴ (B2); 401 ² (A); 540 ¹ (A); 603 ¹ (B1); 653 ¹ (B2)	

^a Number of isolates in superscript.

^b Two CTX-M-1, three CTX-M-3, two CTX-M-10, three CTX-M-15, three CTX-M-32 and two CTX-M-9 + SHV-12.

3.4. Phylogenetic groups in relation to sequence types

A strong association between STs and phylogenetic groups was found, as all 23 isolates of the ST10 and ST23 complexes were phylogroup A. Also, of eight ST131 isolates, seven belonged to the virulent extraintestinal phylogroup B2, and the three ST117 isolates belonged to phylogroup D (Table 1).

4. Discussion

We characterised the population structure of 92 *E. coli* isolates carrying eight types of ESBLs, seven of the CTX-M family. Several findings are of epidemiological and microbiological interest: (i) a great diversity of MLST types was observed; (ii) the *E. coli* isolates belonging to the most common STs or ST complexes could carry almost all of the ESBL types identified in this study; and (iii) ST10 complex (the most frequent in this study and also in the MLST database) carried five different ESBLs (CTX-M-14, SHV-12, CTX-M-9, CTX-M-15 and CTX-M-32).

The spread of ST131/B2 CTX-M-15-producing *E. coli* isolates, previously described in Madrid, Spain [5], and in other countries [6–8], was not observed in this study. In fact, of the three CTX-M-15-producing isolates, only one was ST131/B2 whilst the other two belonged to STs 167 and 653. Plasmids that carry CTX-M-15 are well disseminated among circulating virulent ST131/B2 *E. coli* strains

in some geographic areas [6–8,13]; however, we found that ST131 *E. coli* not only carried CTX-M-15 but also CTX-M-9, CTX-M-10, CTX-M-14, SHV-12 and CTX-M-1. These results agree with the very recent description of ST131 *E. coli* harbouring *bla*_{CTX-M-2-group} and *bla*_{CTX-M-14} in Japan [9]. Unlike the epidemic ST38 *E. coli* described in Japan that is associated with CTX-M-9-group ESBLs [9], we detected only one ST38 isolate producing CTX-M-14.

In a recent French study, ST131 and ST10 complex isolates were found to be the most prevalent among faecal samples from healthy carriers of nalidixic acid-resistant (but ESBL-negative) *E. coli* [14]. In England, 59% of uropathogenic *E. coli* were ST131 (98.1% of them resistant to cefpodoxime); the next most prevalent strains, ST73 and ST95 (6.8% each) [15], were not detected in our study.

None of the ESBL-producing *E. coli* analysed in this study caused outbreaks in any of the participating Spanish hospitals. However, we have previously reported the epidemic dissemination of a clonal CTX-M-15-producing *E. coli* in community healthcare centres, long-term care facilities and hospitals in the Madrid area [5]. Two epidemiological scenarios are possible: the clonal spread of a few specific strains; and the dissemination of *bla*_{ESBL} genes among a diverse population of *E. coli*. The two models can occur simultaneously or separately, thereby contributing to the rapid dissemination of ESBLs.

In this study, we characterised the population structure of 92 *E. coli* isolates carrying eight ESBL types, with seven from the CTX-M family. Although a diversity of MLST types was observed, *E. coli* belonging to the most common STs or ST complexes (ST131, ST10 complex and ST23 complex) can carry almost all of the ESBL types. *Escherichia coli* ST131 carried not only CTX-M-15 but also CTX-M-9, CTX-M-10, CTX-M-14, SHV-12 and CTX-M-1.

Acknowledgments

The authors are grateful to the following participants for their help during collection of the isolates for this project: L. Matas and M. Giménez (Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona); I. Sanfeliu (Corporació Hospitalària Parc Taulí, Sabadell); G. Prats (Hospital Vall d'Hebron, Barcelona); M. Ruíz and J. Vila (Hospital Clínic, Barcelona); A. Domínguez (Hospital de Bellvitge, Hospitalet); A. Guerrero and J. Colomina (Hospital de La Ribera, Alzira); A. Pascual (Hospital Virgen de la Macarena, Sevilla); and J. Aznar (Hospital Virgen del Rocío, Sevilla).

Funding: This study was partially supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI04339, PI040162, PI040837 and PI042012), the Instituto de Salud Carlos III – FEDER, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI C03/14) and the Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008).

Competing interest: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

- Oteo J, Lázaro E, de Abajo FJ, Baquero F, Campos J. Antimicrobial-resistant invasive *Escherichia coli*, Spain. *Emerg Infect Dis* 2005;11:546–53.
- Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl. 1):144–53.
- García A, Navarro F, Miró E, Villa L, Mirelis B, Coll P, et al. Acquisition and diffusion of *bla*_{CTX-M-9} gene by R478-IncHI2 derivative plasmids. *FEMS Microbiol Lett* 2007;271:71–7.
- Novais A, Cantón R, Valverde A, Machado E, Galán JC, Peixe L, et al. Dissemination and persistence of *bla*_{CTX-M-9} are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1-alpha, and IncFI groups. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2741–50.
- Oteo J, Navarro C, Cercenado E, Delgado-Iribarren A, Wilhelmi I, Orden B, et al. Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J Clin Microbiol* 2006;44:2359–66.

- [6] Lau SH, Kaufmann ME, Livermore DM, Woodford N, Willshaw GA, Cheasty T, et al. UK epidemic *Escherichia coli* strains A–E, with CTX-M-15 β -lactamase, all belong to the international O25:H4-ST131 clone. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:1241–4.
- [7] Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis* 2008;14:195–200.
- [8] Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:273–81.
- [9] Suzuki S, Shibata N, Yamane K, Wachino J, Ito K, Arakawa Y. Change in the prevalence of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:72–9.
- [10] Diestra K, Coque TM, Miró E, Oteo J, Nicolau CJ, Campos J, et al. Characterization and molecular epidemiology of ESBL in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in 11 Spanish hospitals (2004) [in Spanish]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26:404–6.
- [11] Diestra K, Juan C, Curiao T, Moyá B, Miró E, Oteo J, et al. Characterisation of plasmids encoding *bla*_{ESBL} and surrounding genes in Spanish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:60–6.
- [12] Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:4555–8.
- [13] Clermont O, Lavollay M, Vimont S, Deschamps C, Forestier C, Branger C, et al. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:1024–8.
- [14] Leflon-Guibout V, Blanco J, Amaqdouf K, Mora A, Guize L, Nicolas-Chanoine MH. Absence of CTX-M enzymes but a high prevalence of clones, including clone ST131, among the fecal *Escherichia coli* isolates of healthy subjects living in the Paris area. *J Clin Microbiol* 2008;46:3900–5.
- [15] Lau SH, Reddy S, Cheesbrough J, Bolton FJ, Willshaw G, Cheasty T, et al. Major uropathogenic *Escherichia coli* strain isolated in the northwest of England identified by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2008;46:1076–80.